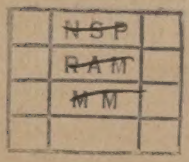
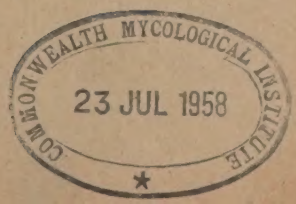
ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. VI No 4

1 9 5 7





POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. VI No 4

1957
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek-korespondent PAN — Lublin, Kazimierz Bassalik, członek rzeczywisty PAN — Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Wrocław, Eugeniusz Pijanowski członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Sekretarz Redakcji — Natalia Balicka

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE – WROCŁAW 1958

Nakład 1083+97 egz.	*Oddano do składania 2. I. 1958 r.*
Ark. wyd. 9,5 druk. 7,5	*Podpisano do druku 23. V. 1958 r.*
Pap. druk. sat. kl. III, 80 g+kreda 90 g	*Druk ukończono w maju 1958 r.*
Cena zł 25.–	*Zam. nr 17/57 – P-2*

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 311—320

Z. Lorkiewicz, E. Hulanicka i *H. Weinrauder*

BADANIA NAD BUDOWĄ ANTYGENOWĄ FORM *L 3A* i *3B PROTEUS VULGARIS*

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wpłynęło dnia 23 września 1957 r.

Dotychczasowe badania nad formami *L* zwracały większą uwagę na zmiany morfologiczne i fizjologiczne niż na budowę antygenową tych postaci.

Przyczyn tego należy dopatrywać się w trudnościach związanych z otrzymywaniem antygenu form *L*. Dla tych celów nadają się raczej ustalone szczepy *L*, przystosowane do podłoża stałego i wielokrotnie na nim pasażowane. Tego rodzaju hodowle wykazują znacznie obfitszy wzrost niż szczepy niezaadaptowane.

Szczególnie trudno jest uzyskać odpowiednią ilość antygenu z form *L* typu *3A*, które zazwyczaj wymagają dodatku surowicy do podłoża i tworzą nikłe kolonie wrośnięte głęboko w agar. Poza tym często postacie *L* nie nadają się do badań serologicznych jako antygeny, ponieważ występuje u nich niejednokrotnie zjawisko autoaglutynacji.

Warto przy tym zaznaczyć, że budowa antygenowa zarazków z grupy podobnych do pleuropneumonii została dosyć dokładnie opracowana i uwzględniona w ich klasyfikacji (Sabin, 1941).

Po odkryciu form L_1 przez Klieneberger w 1935 r. rozgorzała ożywiona dyskusja nad stosunkiem postaci L_1 do *Streptobacillus moniliformis*. W tym czasie próbowano po raz pierwszy przy użyciu metody aglutynacyjnej wyjaśnić powinowactwo *Str. moniliformis* do form L_1. Pracy tej podjęli się Dawson i Hobby w r. 1939 (według Dienesa i Weinbergera, 1951). Zastosowali oni odczyn aglutynacji i adsorpcji aglutynin. Wykazali przy tym, że nie ma znaczniejszych różnic w budowie antygenowej między *Streptobacillus moniliformis* a postacią L_1.

Po dziesięciu latach Tulasne (1949) wykonał obszerne badania nad

budową antygenową pałeczki odmieńca i jego form *L*. Uczony zauważył, że podczas transformacji postaci bakteryjnych w formy *L* drobnoustroje tracą antygen rzęskowy zachowując antygen somatyczny. Następnie Tulasne i Brisou (1955) wykazali, że antygen somatyczny postaci *L* nie jest identyczny z antygenem somatycznym drobnoustrojów macierzystych. Stwierdzono różnice ilościowe, przy czym postacie *L* zawierały mniejszą ilość antygenu somatycznego *O* niż pałeczki macierzyste.

Formy *L* pochodzące od drobnoustrojów różnych gatunków wykazują wyraźne podobieństwo kształtu, wielkości i wyglądu kolonii oraz części składowych tych mikrokolonii. Postawiono sobie zatem pytanie czy formy *L* różnych gatunków bakterii, identyczne pod względem morfologicznym, nie wykażą również podobieństwa w budowie antygenowej. Zagadnieniem tym zajął się Dienes wraz z współpracownikami (Dienes *et al.* 1950 a, b, Weinberger *et al.* 1950). Badali oni, stosując odczyn aglutynacji i adsorpcji aglutynin, pokrewieństwo antygenowe między formami *L Proteus* i *Salmonella* a drobnoustrojami macierzystymi. Wykazali przy tym, że surowica przeciwbakteryjna aglutynuje bakterie oraz postacie *L*, a surowica przeciw formom *L* aglutynuje nie tylko postacie *L*, ale również bakterie. Antygeny *L* aglutynowane były jednak słabiej od antygenów bakteryjnych.

Dienes tłumaczy to zjawisko słabszą aglutynacyjnością postaci *L* niż form bakteryjnych. Stwierdzono, że surowice przeciwko *S. typhosa* i jej formom *L* nie aglutynują antygenów *S. typhimurium* ani jej postaci *L*.

Podczas procesu transformacji różnych gatunków *Salmonella* w postacie *L* utrzymują się zatem różnice antygenowe. Nawet w obrębie jednego gatunku *Proteus vulgaris* wykazano różnice antygenowe po przejściu różnych szczepów (Nr *3* i *52*) w postacie *L*.

Dienes z współpracownikami (1950 b) wykazał, że formy bakteryjne *Proteus* mają pełniejszą budowę antygenową niż formy *L*. Stosunkowo łatwo wysycali oni surowicę anty-L pałeczkami, nie udało im się natomiast wysycić surowicy przeciwbakteryjnej antygenem *L*. Wyniki swoje potwierdzili oni w odczynie precypitacji, stosując jako antygen przesącz zawiesiny form *L Proteus* lub wyciąg z pożywki agarowej z hodowlą postaci *L*.

Prittwitz-Gaffron (1955) uzyskała wyniki podobne do rezultatów Tulasne'a i Dienesa. Doszła ona do wniosku, że formy *L* posiadają antygen *O*, są natomiast pozbawione częściowo lub całkowicie antygenu rzęskowego. Badaczka zwróciła przy tym uwagę na autoaglutynację zawiesiny form *L*. Horoszewiczowie (1956) wykonywali odczyny aglutynacji z postaciami *L Proteus mirabilis*. Surowice przeciwbakteryjne oraz przeciw formom *L* aglutynowały do jednakowego miana antygeny bakteryjne i *L*.

BADANIA WŁASNE

Celem naszych doświadczeń było przebadanie pokrewieństwa antygenowego *Proteus vulgaris* oraz jego form *L* typu *3A* i *3B*. Dotychczas opublikowane prace dotyczyły głównie budowy antygenowej postaci *L* typu *3A*.

W badaniach zastosowaliśmy odczyn aglutynacji z adsorpcją aglutynin oraz odczyn precypitacji i precypitacji dyfuzyjnej.

Do doświadczeń użyto szczepu *Proteus vulgaris* 12 oraz pochodzących zeń form *L*. Postacie *L* typu *3A* były pasażowane ponad 100 razy na agarze z surowicą końską. Ze względu na to, że postacie *L* na agarze z surowicą tworzyły kolonie drobne wrośnięte w podłoże, tak że „zbiór" antygenu był bardzo skąpy, zastosowano hodowlę na agarze z dodatkiem 0,7% węgla adsorpcyjnego Hopkin-Williamsa, wprowadzoną przez jednego z autorów (Lorkiewicz, 1957). Na podłożu tym, po adaptacji w ciągu kilkunastu pasaży, formy *L* typu *3A* tworzyły duże, śluzowate kolonie, rosnące bardziej powierzchniowo niż na agarze surowiczym. Używano zatem agaru miękkiego 1,2-1,5% o *pH* 7,8, z dodatkiem 0,7% węgla aktywowanego i 500 jednostek penicyliny na ml pożywki. Wysiewy dokonywano metodą kostkową według Klieneberger-Nobel (1949) lub hodowlę przenoszono do probówki z bulionem i perełkami szklanymi, homogenizowano przez wstrząsanie i wylewano na płytki. Zasiane płytki inkubowano w cieplarce w wilgotnej atmosferze przy temperaturze 37° przez 4 dni.

Szczep *L* typu *B* pasażowano 36 razy w hodowli wgłębnej a następnie 18-24 razy na powierzchni agaru z penicyliną. W ciągu 3 dni wyrastały stosunkowo nieliczne kolonie, które następnie rozprowadzano po płytce. Po 2-4 dniach powierzchnia płytki była pokryta drobnymi (wtórnymi) i gdzieniegdzie większymi (pierwotnymi) koloniami.

Zawiesinę form *L* typu *3A* i *3B* dla przygotowania antygenu otrzymywano przez zbieranie hodowli ezą i spłukiwanie jej z płytek płynem fizjologicznym.

Zawiesinę pałeczek odmieńca oraz postaci *L* przemywano w płynie fizjologicznym 3 razy przed sporządzeniem antygenów.

Z badań Vendrelyego i Tulasne'a (1952) wynikało, że podczas płukania form *L* w płynie fizjologicznym oraz przy zastosowaniu wirówki o stosunkowo niedużej ilości obrotów (5000 obr./min.) znaczny odsetek ciałek elementarnych zostanie stracony. Dlatego też do produkcji antygenu użyto również zawiesinę form *L* nie płukanych. Aby usunąć z zawiesiny *L* większe cząstki agaru przetrzymywano ją w chłodni w ciągu kilku dni i dekantowano. Materiał ten mógł zawierać zanieczyszczenia agarowe, nie został jednak pozbawiony najdrobniejszych

elementów populacji *L*. Ze względu na to, że wyniki uzyskane z antygenami sporządzonymi z płukanych jak i nie płukanych form *L* były podobne, nie będziemy ich podawać osobno.

Do uodpornienia królików użyto antygenów gotowanych (*Proteus vulgaris* przez 2 godziny, formy *L* przez 1 godzinę) oraz formolizowanych (do zawiesiny dodawano 0,5% formolu i przetrzymywano przez 3 dni w cieplarce, kontrolując jałowość antygenu). Tak otrzymywanymi antygenami uodparniano króliki. Zwierzętom podawano dożylnie co tydzień wzrastające dawki antygenu: 0,25, 0,5 1, 1,5 i 2,0 ml. W tydzień po ostatniej iniekcji pobierano krew.

Surowice odpornościowe konserwowano przy pomocy mertiolatu (1 : 5000).

Antygeny do wykonywania odczynów aglutynacji przygotowywano w identyczny sposób jak i do uodparniania, z wyjątkiem antygenu gotowanego form *L* typu *3A*, który dawał zjawisko termoaglutynacji. Wobec tego użyto gotowanej zawiesiny postaci *L 3A* hodowanej na agarze zawierającym zamiast węgla 10% surowicy końskiej.

Do odczynów precypitacji stosowano antygen zawierający między innymi frakcję polisacharydową. Otrzymano go przez gotowanie bakterii lub form *L* w płynie fizjologicznym przez 30 minut, następnie zalanie 4-krotną objętością 96-procentowego alkoholu i przetrzymywanie przez noc w lodówce. Wytrącający się kłaczkowaty osad odwirowywano i rozpuszczano w płynie fizjologicznym. Oprócz tego antygenu, który dla uproszczenia będziemy określać jako antygen polisacharydowy, przygotowano hydrolizat zasadowy bakterii oraz form *L*, otrzymany przez zadziałanie 0,1 N NaOH (antygen „białkowy").

Przy omawianiu poszczególnych antygenów będziemy używać następujących symboli:

antygen bakteryjny gotowany — *O*
antygen bakteryjny formolizowany — *OH*
antygen *L* form typu *B* gotowany — *Bo*
antygen *L* form typu *B* formolizowany — *Bf*
antygen *L* form typu *A* gotowany — *Ao*
antygen *L* form typu *A* formolizowany — *Af*

ODCZYN AGLUTYNACJI

Odczyny te wykonywano w 2-3 powtórzeniach, a odczyny adsorpcji aglutynin powtarzano czterokrotnie.

Aglutynaty *L* form były mniej wyraźne, słabiej zlepione od aglutynatów bakteryjnych. Wyglądem swoim przypominały raczej precypitaty

niż aglutynaty. Niekiedy otrzymywano nieswoisty odczyn (autoaglutynacja antygenu).

Podobnie jak Dienes, również i my najwyższe miana otrzymywaliśmy z antygenem *O* zarówno przy użyciu surowicy przeciwbakteryjnej *O*, jak i surowic przeciw postaciom *L*. Z surowicą anty-*OH* odczyn aglutynacji wystąpił do miana 1 : 640. Antygen bakteryjny *OH* (formolizowany) był aglutynowany nawet przez silnie rozcieńczone surowice przeciw *O*, *OH*, *Bf* i *Bo*. W odróżnieniu od antygenu *O* antygen *OH* był stosunkowo słabo aglutynowany przez surowice anty-*Ao* i anty-*Af*. Antygen *Bo* dawał reakcje dodatnie w wysokim mianie z surowicami homologicznymi oraz z surowicą anty-*OH*. Słabsze rezultaty uzyskano natomiast z surowicami anty-*Ao* i *Af*. Antygen *Bf* tym różnił się od poprzedniego, że słabiej reagował z surowicami anty-*A* oraz anty-*Bo* niż z surowicą przeciwbakteryjną lub homologiczną. Antygen *Ao* dawał najlepszą aglutynację z surowicą homologiczną oraz anty-*O*, a najsłabszą z surowicami anty-*Bo* i anty-*Bf*. Z użytych antygenów najsłabiej reagował antygen *Af*. Ze wszystkimi surowicami otrzymano aglutynację do rozcieńczenia 1 : 320, a z surowicą anty-*Bo* tylko do rozcieńczenia 1 : 80 (tab. I). Na dokładniejszą analizę zasługują stosunki między typem *A* i *B* form *L*. Odmiany te dają wprawdzie krzyżowe reakcje aglutynacji, jednak do wyższego miana reagują z surowicami homologicznymi.

Tabela I
Odczyn aglutynacji — Agglutination test

Antygeny Antigens	Surowica anty-			Serum anti-		
	Prot. O	*Prot. OH*	*L Bo*	*L Bf*	*L Ao*	*L Af*
Proteus O	2560	640	1280	2560	2560	1280
Proteus OH	2560	2560	1280	2560	320	320
L Bo	640	1280	2560	1280	640	320
L Bf	1280	2560	320	2560	320	160
L Ao	1280	640	160	320	2560	640
L Af	320	320	80	320	320	320

Zwraca również uwagę fakt silniejszego aglutynowania przez surowice anty-*OH* antygenów *B* niż antygenów *A*. Również surowice anty-*B* aglutynowały antygen *OH* w wyższym rozcieńczeniu niż surowice anty-*A*.

Wyniki te zdawały się wskazywać na to, że antygeny *L* typu *A* i *B* nie są identyczne. Przypuszczaliśmy, że w formach typu *B* występują resztki antygenu rzęskowego. Aby to wyjaśnić, wykonano odczyny wysycania surowic. Do doświadczeń oprócz wyżej opisanych surowic użyliśmy surowic anty-*H* przeciw antygenowi rzęskowemu *Proteus vulgaris*

(*H*), który otrzymano przez wysycenie surowicy anty-*OH* antygenem *O*. Surowice anty-*O*, anty-*OH* oraz anty-*H* wysycano antygenami formolizowanymi *A* i *B*. Okazało się, że wysyciły one surowicę anty-*O* i anty-*OH* tylko częściowo (w 50%). Również antygen *Bf* wysycał surowicę anty-*H* w nieznacznym stopniu (spadek miana o 25%). Surowica anty-*Bf* była tylko częściowo (w 30-60%) wysycana przez antygen *Af*. Surowica anty-*Af* została natomiast we wszystkich powtórzeniach całkowicie wysycona przez antygen *Bf*.

ODCZYNY PRECYPITACJI

Badania przeprowadzono przy zastosowaniu precypitacji probówkowej oraz precypitacji dyfuzyjnej w agarze na płytkach.

Do odczynu precypitacji zwykłej używano surowicy dwukrotnie rozcieńczonej oraz antygenów w rozcieńczeniach od 1 : 2 do 1 : 32. Wyniki odczytywano po 20 minutach inkubacji przy 37°.

Tabela II
Odczyn precypitacji — Precipitation test

Antygeny Antigens	Surowica anty-		Serum anti-	
	P. vulgaris O	*P. vulgaris OH*	*L Bf*	*L Af*
Pp	32	32	32	16
Pb	32	32	32	32
Bp	32	32	32	16
Bb	—	16	32	8
Ap	32	8	16	32
Ab	—	8	16	16

P — *Proteus*
B — formy *L*, typ *B*
L forms, type *B*
A — formy *L*, typ *A*
L forms, type *A*

p — antygen polisacharydowy
polisaccharide antigen
b — antygen białkowy
proteide antigen

Do precypitacji dyfuzyjnej na płytkach stosowano 1,5-procentowy agaroid. Agaroid uprzednio płukano trzykrotnie i rozpuszczano w wodzie destylowanej oraz sączono przez bibułę. Jako środka konserwującego dodawano mertiolatu w stężeniu 1 : 10 000. W jednej serii dodano do agaroidu oranżu metylowego w rozcieńczeniu 3 : 100 000. Barwik ten jednak nie zwiększał kontrastowości precypitatów, przeto zaniechano używania go w dalszych seriach. Agaroid wylewano na płytki o średnicy 60 mm cienką warstwą denną. Po zastygnięciu jej wylewano grubszą warstwę (7-9 mm), w której dzięki założonej, oparafinowanej szkla-

nej matrycy powstawały trzy zagłębienia o przekroju okrągłym, średnicy 5 mm, odległe od siebie o 1,2 cm. Do dwóch zagłębień nalewano antygeny, do trzeciego surowicy odpornościowej. Po uszczelnieniu plasteliną brzegów płytek inkubowano je przez 2 dni w cieplarce w temperaturze 37°, a następnie w temperaturze pokojowej. Do wykonania precypitacji dyfuzyjnej na płytkach używano oprócz wyciągu białkowego i polisacharydowego również antygeny gotowane i formolizowane, którymi uodparniano króliki. Wyniki podaje tabela II.

Podobnie jak w odczynach aglutynacji, również i w reakcji precypitacji surowice anty-*B* reagowały do wyższego miana z antygenem *B* niż *A*, surowica zaś anty-*A* lepiej precypitowała antygen homologiczny niż antygen *B*. Surowica anty-*O* reagowała jednakowo z antygenem *B* i *A*. Surowica anty-*OH* lepiej precypitowała antygen *B* niż *A*.

Te różnice między antygenami *A* i *B* zaznaczają się nie tylko w reakcjach z surowicami przeciw formom *L* formolizowanym, lecz również z surowicami otrzymywanymi przeciw postaciom *L* ogrzewanym.

PRECYPITACJA DYFUZYJNA

Oprócz wyciągów polisacharydowych i białkowych do precypitacji dyfuzyjnej używano również antygenów stosowanych do szczepień królików. Antygeny bakteryjne *O* i *OH* nie powodowały powstawania pasm precypitatu, prawdopodobnie wskutek zbyt dużych cząstek uniemożliwiających dyfuzję. „Pełne" (tzn. ogrzewane lub formolizowane) antygeny postaci *L* dawały natomiast wyraźne precypitaty. Zwykle już po dwóch dniach inkubacji w temperaturze 37° pojawiły się pasma precypitacyjne. Po przetrzymaniu następnie płytek w temperaturze pokojowej pasma stawały się wyraźniejsze. Antygen *B* ogrzewany dawał zwykle 2 pasma precypitatu z surowicą homologiczną anty-*Ao* i anty-*OH*. W jednym przypadku z surowicą homologiczną powstała większa ilość pasm, ale były one mało wyraźne.

Antygen *B* formolizowany dawał 1 pasmo precypitacyjne z wyżej wymienionymi surowicami. Antygeny *A* ogrzewany i *A* formolizowany reagowały z surowicą anty-*Ao* wytwarzając 1 pasmo, natomiast z surowicami anty-*Bo* i anty-*H* w ogóle nie wytworzyły precypitatu.

Charakterystyczny obraz obserwowano na jednej z płytek między surowicą anty-*A* a antygenami ogrzewanymi *B* i *A*. Otrzymano podwójne pasma z antygenem *B*, a pojedyncze z antygenem *A*, z tym, że jedno z pasm *B* było połączone z pasmem *A*. Świadczy to o występowaniu wspólnego antygenu w obu typach, przy czym typ *B* dawał dodatkowe pasmo, nie powstające z antygenem *A*.

Wyniki uzyskane z antygenami polisacharydowymi *A* i *B* są nieco

inne niż z antygenami pełnymi. W żadnym przypadku nie uzyskano pasma podwójnego i reakcję dodatnią stwierdzono tylko z surowicami anty-*OH* i anty-*B*, z surowicą anty-*A* brak było natomiast precypitatu. Antygen polisacharydowy *A* reagował z surowicą anty-*OH*, która nie precypitowała antygenów *A* ogrzanych lub formolizowanych. Pasma precypitacyjne pojawiły się jednak dopiero po 6 dniach i były stosunkowo nikłe. A więc i w tym przypadku postacie *B* wykazywały silniejsze powinowactwo do surowicy anty-*OH* niż formy *A*.

DYSKUSJA

Formy *L* typu *B* powstają równolegle z postaciami typu *A*. Różnice między tymi dwoma typami wyrażają się w wymaganiach wzrostowych. Postacie *A* wymagają do swojego wzrostu dodatku surowicy, ryboflawiny albo węgla adsorpcyjnego. Działanie tych substancji polega prawdopodobnie na neutralizacji inhibitora wytwarzanego podczas namnażania postaci *L*. Kolonie typu *B* można natomiast hodować na zwykłym agarze. Hodowane bez dodatku penicyliny formy *A* rewersują zwykle po 24 godzinach do postaci bakteryjnych. Dienes (1949) zauważył, że typ *B* daje rewersję wcześniej od typu *A* (w ciągu kilku godzin). Kolonie typu *A* można hodować na agarze surowiczym bez penicyliny. Po kilkunastu, a czasami kilkudziesięciu takich pasażach stwierdza się zanik zdolności powrotu do formy bakteryjnej. Szczep taki nazywamy szczepem ustalonym. W pełni ustalonych form *L* typu *A* nie udaje się przeprowadzić z powrotem w postać bakteryjną, nawet po zadziałaniu na nie szokiem cieplnym lub osmotycznym, promieniami pozafiołkowymi, chlorkiem litu, kolchicyną i barwikami (Z. Lorkiewicz i A. Guszkowska — nie opublikowane). Nie udaje się natomiast ustalić kolonii typu *B*. Zmiany zaszłe podczas przemiany bakterii w typ *B* są zatem mniejsze niż przy przejściu w postać *A*. Za tym, że formy *A* są mniej zbliżone do postaci bakteryjnych niż formy *B* przemawiają ponadto obserwacje Dienesa (1949). Przeprowadzał on formy *B* w postacie *A*, to znaczy typ stale i łatwo powracający do formy bakteryjnej w postać, którą można utrwalić. Udało mu się również przeprowadzić hodowlę *A* w *B*.

W pracy naszej wykazaliśmy, że różnice między dwoma typami uwydatniają się także w budowie antygenowej. Postacie *B* mają pełniejszą budowę antygenową niż formy *A*, o czym świadczy po pierwsze wytwarzanie dwu pasm precypitatu z formami *B*, a jednego z formami *A*. Po drugie surowicę anty-*A* można było łatwo i całkowicie wysycić antygenem *B*, nie udawało się natomiast wyadsorbować surowicy anty-*B* antygenem *A*.

Im wyższy zatem jest stopień transformacji, tym uboższe powstają postacie w antygeny.

Po trzecie nie jest wykluczone, że typ *B* zawiera resztki antygenu rzęskowego, którego brak w formach *A*. Wskazują na to wyższe miana aglutynacji antygenu *Bf* z surowicą anty-*Bf* niż anty-*Bo*. Surowica anty-*OH* aglutynowała do wyższego miana antygen *B* niż antygen *A*, antygen zaś *Proteus OH* był silniej aglutynowany przez surowice anty-*B* niż anty-*A*. Natomiast w krzyżowych reakcjach z antygenem *O* lub surowicą anty-*O* i form *L* typu *A* i *B* nie znaleziono większych różnic. Bardzo słabe wysycenie (tylko 25%) surowicy anty-*H* przez antygen *Bf* można by tłumaczyć nieznaczną ilością antygenu *H*, jaka zachowała się w formach typu *B*. W obu typach (*A* i *B*) zatracie uległa część antygenu *O* (nie udało się uzyskać kompletnego wysycenia surowicy anty-*O* zawiesiną form *B* lub *A*). Można więc wyprowadzić pewne zależności między stopniem przekształcenia a budową antygenową.

W odczynie precypitacji dyfuzyjnej stwierdziliśmy, że formy *L*, w odróżnieniu od postaci bakteryjnych, dyfundują przez agar. Prawdopodobnie dyfundowały tylko ciałka elementarne oraz formy pośrednie, wątpliwe zaś jest aby duże ciała, których średnica dochodzi do 20 μ, mimo ich znacznej elastyczności mogły przenikać przez agar.

Hodowla *L* jest, jak się okazało, bardziej zróżnicowana niż hodowla bakteryjna. Należałoby w przyszłych badaniach rozfrakcjonować zawiesinę postaci *L* i badać oddzielnie poszczególne frakcje.

LITERATURA

Dienes L., 1949: The development of *Proteus* cultures in the presence of penicillin. *J. Bact.*, **57** : 529.

Dienes L., Weinberger H. J. and Madoff S., 1950: The transformation of typhoid bacilli into *L* forms under various conditions. *J. Bact.*, **59** : 755.

Dienes L., Weinberger H. J., and Madoff S., 1950: Serological reaction of *L* type cultures isolated from *Proteus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **75** : 409.

Dienes L. and Weinberger H. J., 1951: The *L* forms of bacteria. *Bact. Rev.*, **15** : 245.

Horoszewicz A. i Horoszewicz J., 1956: Obserwacje nad wpływem penicyliny i innych antybiotyków na postacie *L Proteus mirabilis*. *Acta Microbiol. Polon.*, **5** : 9.

Klieneberger-Nobel E., 1949: Origin, development and significance of *L* forms in bacterial cultures. *J. gen. Microbiol.*, **3** : 434.

Lorkiewicz Z., 1957: Growth of stabilized *L* forms of *Proteus vulgaris* without the addition of serum and penicillin., *Acta Microbiol. Polon.*, **6** : 3.

Lorkiewicz Z. i Guszkowska A.: nie opublikowane.

Prittwitz-Gaffron von J., 1955: Das Verhalten eines Stammes von *Proteus vulgaris* und seiner *L*-Phase gegenüber homologen Antiseren. *Zentr. Bakter. I. Orig.*, **163** : 313.

Sabin A. S., 1941: The filtrable microorganisms of the pleuropneumonia group. *Bact. Rev.*, **5** : 1.

Tulasne R., 1949: Sur une evolution du Proteus vers des microcolonies et des forms isolated from *Salmonella* and the isolation of *L* forms from *Shigella*. **143** : 289.

Tulasne R. et Brisou J., 1955: Les Pleuropneumoniales, taxonomic des pleuropneumonia like organisms et des formes *L*. *Ann. Inst. Pasteur.*, **88** : 237.

Weinberger H. J., Madoff S. and Dienes L., 1950: The properties of *L* forms isolated from *Salmonella* and the isolation of *L* forms from *Shigella*. *J. Bact.*, **59** : 765.

Vendrely R. et Tulasne R., 1952: Premières observations sur la constitution chimique des formes *L* des bactéries. *Bull. Soc. de Chimie Biol.*, **34** : 785.

Z. Lorkiewicz, E. Hulanicka and *H. Weinrauder*

STUDIES ON ANTIGENIC STRUCTURE OF *L* FORMS, TYPE *3A* AND *3B*, OF *PROTEUS VULGARIS*

Summary

The antigenic structure of *3B L* forms and stabilised *3A L* forms of *Proteus* was studied by agglutination, absorbtion of agglutinins and precipitation-reactions. Results of experiments are illustrated by tables I and II.

There is difference in antigenic structure between forms *3B* and *3A*. The anti-*H* serum was absorbed only in 25% by means of *Bf* antigens.

The complex of somatic antigens of *Proteus* was also more complete in form *3B* than in *3A*.

It is evident that changes in antigenic structure of *L* forms are parallel to changes in their morphology and physiology.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 321—329

W. Kunicki-Goldfinger i *S. Rowiński*

PRZYCZYNEK DO POZNANIA BUDOWY KOLONII BAKTERYJNEJ

Z Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego i Zakładu Mikrobiologii Ogólnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda we Wrocławiu *

Wpłynęło dnia 1 września 1957 r.

Kolonie bakteryjne, jakie obserwujemy na stałych podłożach laboratoryjnych, są w pewnym stopniu tworami sztucznymi, nie spotykanymi w naturze. Mikroskopijne skupiska bakterii rozwijające się w glebie mają zgoła inny charakter. Opisane przez Molischa „kolonie" — występujące jako duże nagromadzenia masy drobnoustrojów w glebie niektórych okolic Japonii — zostały zaledwie pobieżnie zbadane.

Skupiska bakterii chorobotwórczych w zakażonym organizmie zwierzęcia lub człowieka powstają zwykle w wyniku reakcji obronnej makroorganizmu, izolującej zarazek. Jedyny udokumentowany przypadek powstawania niemal typowych kolonii w organizmie opisała Davidson (1948) przy zakażeniu pałeczką Friedländera osobnika dotkniętego agranulocytozą. Bakterie tworzyły tu duże (do 5 mm średnicy), „czyste" kolonie — zwłaszcza w wątrobie.

Mimo to jednak szczegóły budowy i mechanizm powstawania kolonii wydają się godne zainteresowania, przede wszystkim z uwagi na znaczenie jakie mają dla rozstrzygnięcia zagadnienia wewnętrznej regulacji i koordynacji między komórkami.

Mechanizm powstawania i wzrostu kolonii oraz czynniki warunkujące jej charakter były przedmiotem wielu badań (między innymi: Felsenreich i Trawiński, 1916; Fleck i Elster, 1932; Knaysi, 1951; Stöss, 1955; Benecke, 1912; Orsos, 1910; Legroux i Magrou, 1920; Kořinek, 1948; Zikes, 1916). Wielu badaczy oparło się przy tym na obserwacjach wewnętrznej budowy ko-

* Praca wykonana została w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie w latach 1954/1955.

lonii, uzyskanych przy pomocy metod histologicznych (przegląd starszej literatury dotyczącej tych prac zawarty jest w doniesieniach Zikesa, 1916 oraz Legroux i Magrou, 1920, nowszej u Greene'a, 1938 i Stössa, 1955).

BADANIA WŁASNE

Materiałem badań były kolonie bliżej nieznanej laseczki, *Bacillus sp.*, Nr *949* wyosobnionej z treści jelitowej *Cletrionomys graveolens*.

Była to gramdodatnia, smukła laseczka (2,6-2,8×0,44 μ), umiarkowanie polimorficzna, zarodnikująca, układająca się pojedynczo, lub rzadziej w łańcuszkach 2-4 członowych. Ruchliwa. Na bulionie tworzyła błonkowaty kożuszek opadający na dno i tworzący luźny puszysty osad. Upłynniała żelatynę, rozkładała mocznik, z peptonu wytwarzała duże ilości amoniaku. Jako źródło azotu wykorzystywała amoniak. Temperatura 100°, działająca w ciągu 20 minut, zabijała zarodniki.

Bakteria ta na podłożach agarowych tworzyła błonkowate, szarokremowe lekko pomarszczone kolonie, podobne do kolonii innych laseczek. Natomiast na pożywkach agarowych z dodatkiem glikozy i glicerolu powstawały oryginalne kolonie o kształcie silnie wyniesionego krateru (fot. 4).

METODA BADAŃ

Zależność morfologii kolonii od czynników środowiskowych badano w hodowlach wielogodzinnych, modyfikując temperaturę inkubacji, stężenie agaru i rodzaj źródła węgla.

Wewnętrzną budowę kolonii badano na skrawkach mikrotomowych. Używano tu kolonii w różnym wieku, wyrosłych na agarze odżywczym z dodatkiem 5% glicerolu i 1% glikozy.

Kolonie *in situ* utrwalano mieszaniną Legroux i Magrou (80-procentowy alkohol i formol 1 : 1) lub płynem Bouina *. Utrwalone kolonie odwadniano w alkoholach o wzrastających stężeniach, prześwietlano w terpentynie i ksylolu, po czym zatapiano w parafinie. Posługiwano się mikrotomem korbowym Zimmermanna, lub (rzadziej) saneczkowym Leitza. Grubość skrawków: 1, 1,5 2, 5, 7 i 10 μ. Przy cienkich skrawkach (1-2 μ) struktura kolonii ulegała silnemu zniszczeniu, toteż najczęściej sporządzano skrawki o grubości 5-7 μ.

Skrawki uwalniano od parafiny, uwadniano w szeregu alkoholi o malejącej koncentracji i barwiono.

* Zamrażanie kolonii przy pomocy CO_2 nie pozwalało na otrzymanie dobrych skrawków.

Przy barwieniu preparatów, po wypróbowaniu wielu metod, zastosowano:

a) zmodyfikowaną metodę Legroux i Magrou:

Barwik A:	Błękit eozynowo-metylenowy	1,4 g
	Eozyna	0,3 g
	Błękit toluidynowy	0,1 g
	Alkohol metylowy	100 ml
Barwik B.:	Oranż „G", 0,6-procentowy roztwór wodny	50 ml
	Tanina 20-procentowy roztwór wodny	50 ml
	Woda destylowana	25 ml

Preparat zalewa się barwikiem A, pozostawia go na 3-5 minut, po czym barwi się przez 15-20 minut barwikiem B.

b) metodę Greene'a:

Tionina	0,25 g
Alkohol 50%	100 ml
Fenol 2%	100 ml

Czas barwienia: 2-3 sekund.

c) 0,5% wodny roztwór błękitu toluidynowego. Czas barwienia — 2 sekundy; po spłukaniu barwika — różnicowanie w 60-70-procentowym alkoholu.

Najczęściej stosowano metodę Greene'a, dającą najbardziej kontrastowe obrazy.

Zabarwione preparaty przeprowadzano przez szereg alkoholi o wzrastającym stężeniu aż do absolutnego, ksylol i zatapiano w balsamie kanadyjskim.

WYNIKI I DYSKUSJA

MORFOLOGIA KOLONII

Na agarze odżywczym z dodatkiem 5% glicerolu i 1% glikozy przy inkubacji w temperaturze 37° wzrost, w postaci ledwo widocznych kropelkowych kolonii, pojawia się po 3-4 godzinach. Po 10-10,5 godzinach kolonie powiększają się nieco (fot. 1), następnie pokrywają się matowo-białawą błoną, powiększają znacznie i uwypuklają, tworząc po 18-19 godzinach postać stożkowatą. Po dalszych 2 godzinach inkubacji powstaje charakterystyczna walcowata postać w kształcie jakby głowy (fot. 2), uformowanej z grubej białożółtawej, zwartej błony. Wnętrze kolonii wypełnione jest śluzem.

Z czasem błona marszczy się silniej, wierzchołek kolonii zapada się przybierając niezwykle oryginalną postać „góry stołowej" (fot. 3), a z kolei krateru (fot. 4). W tej formie kolonie utrzymują się przez czas bardzo długi, nieznacznie się tylko zmieniając.

DYSOCJACJA

Przy dłuższej inkubacji płytek, po ca 2 dobach, pojawia się wokół kolonii wtórny wzrost w postaci szarobiaławego, barchanowatego, szorstkiego, płaskiego pierścienia, stanowiącego rodzaj szerokiej podstawy, na której spoczywa wyniesiona część „krateroWata" (fot. 5).

Liczne próby otrzymania hodowli form krateroWatych (*K*), w których nie pojawiałby się wzrost wtórny (*B*) okazały się płone. Cechy morfologiczne, fizjologiczne i wrażliwość bakterii obu form na czynniki szkodliwe (podwyższona ciepłota, dodatek barwików — fioletu krystalicznego i zieleni malachitowej — do podłoża, penicylina) były jednakowe.

Zawsze przy wysianiu formy krateroWatej otrzymywano typowe kolonie, u podstaw których rozwijał się wzrost formy wtórnej (*B*). Przesiewy wzrostu wtórnego (postać *B*) dawały natomiast jedynie kolonie płaskie, szorstkie, typowe dla formy *B*, nigdy nie wytwarzające typu *K*. Wydaje się, że jest to stała, nieodwracalna (lub odwracalna tylko w wyjątkowych przypadkach) dysocjacja, w której z formy śluzowatej (*K*) powstaje postać bezśluzowa (*B*).

WPŁYW PODŁOŻA NA FORMĘ KOLONII

W celu zbadania wpływu niektórych czynników środowiska hodowano formy *K* na agarze odżywczym, agarze odżywczym z 1% glikozy, agarze odżywczym z 5% glicerolu, zmieniając stężenie agaru od 1%, poprzez 1,5, 2 i 3 aż do 4%.

Zależność postaci kolonii od źródła węgla ilustruje poniższe zestawienie:

Wpływ źródła węgla na formę kolonii
agar 2%

Bez dodatków	drobno pofałdowane, błonkowate kolonie z małą ilością śluzu, rzadziej spotykane niskie formy krateroWate.
1% glikoza	kolonie duże, o postaci wydłużonych sopli, wewnątrz bardzo duże ilości rzadkiego śluzu. Błonka okrywająca cienka i słaba. W części kolonii zaczynają się pojawiać krateroWate zagłębienia na wierzchołku. Postać barchanowata (*B*) pojawia się późno.
5% glicerol	kolonie mniejsze i niższe o charakterystycznym kształcie bardziej płaskiego krateru; błonka okrywająca gruba i silniej pofałdowana. Ilość śluzu mierna. Postać barchanowata (*B*) pojawia się stosunkowo wcześnie tworząc wokół kolonii dość szeroką szarawą podstawę.
1% glikoza + 5% glicerol	kolonie mniejsze niż na glikozie, lecz większe niż na glicerolu, typowo krateroWate (fot. 4 i 5). Błonka okrywająca znacznie grubsza niż na podłożu z glikozą, lecz nieco cieńsza niż w obecności samego glicerolu.

Zmniejszenie stężenia agaru prowadziło do formowania kolonii większych, bardziej płaskich, bogatych w śluz. Podwyższanie jego koncentracji powodowało znaczne zmniejszenie rozmiarów kolonii, zachowujących w zasadzie typowy kształt małych „kraterów". Błonka okrywająca stawała się przy tym grubsza i bardziej zwarta.

Przedłużanie inkubacji (nawet do 2 tygodni) nie przynosiło istotnych zmian w zewnętrznym wyglądzie kolonii, poza ich postępującym wysychaniem.

Obserwacje powyższe zdają się potwierdzać przypuszczenie Kořínka i Pokornego (1951) co do znaczenia i roli wydzielania śluzu przez bakterie. Autorzy czescy uważali wydzielanie śluzu (o budowie węglowodanowej) za pewnego rodzaju mechanizm wydalniczy, uruchamiany w przypadku względnego nadmiaru węgla w stosunku do ilości azotu w podłożu.

W naszych doświadczeniach dodatek glikozy wybitnie stymulował produkcję śluzu, niewątpliwie wtórnie wpływając na postać kolonii.

WEWNĘTRZNA BUDOWA KOLONII

W celu zbadania wewnętrznej budowy kolonii sporządzano serie skrawków z kolonii w różnym wieku. Na przekrojach młodych kolonii nie można było dostrzec zróżnicowania wewnętrznego. Dość gęsto ułożone laseczki oraz niewielka ilość substancji międzykomórkowej wypełniały wnętrze kolonii.

Kolonie w wieku ca 17 godzin na przekroju poprzecznym dawały obraz pustej wewnątrz soczewki (fot. 6), z której wypełniający ją śluz uległ wypłukaniu w czasie sporządzania preparatu. Wewnętrzna komora zmniejszała się ku brzegom kolonii (fot. 7), zanikając w końcowych skrawkach zupełnie.

Na przekrojach starszych kolonii o kształcie walca dobrze widoczne było zróżnicowanie na dwie warstwy (fot. 8). Zewnętrzna warstwa błonkowata, złożona z gęsto ułożonych komórek, barwiąca się metodą Greene'a i błękitem toluidyny ciemnoniebiesko lub purpurowo w części przylegającej do agaru, otaczała jasnofioletowe, śluzowate wnętrze kolonii, wypełnione śluzem i nielicznymi rozrzuconymi w nim bakteriami.

Typowe kolonie „kraterowate" dawały obraz widoczny na fot. 9.

W miarę starzenia się kolonii zewnętrzna błonka, okrywająca środkową komorę śluzową, ulega zgrubieniu i silnemu pofałdowaniu (fot. 10 i 11). Na przekrojach widoczne są wówczas liczne komory.

Błonka okrywająca ma budowę zwartą, zbitą, przypuszczalnie wskutek wysychania i twardnienia śluzowej substancji międzykomórkowej.

Komórki bakteryjne u podstawy kolonii są średnio długie, często połączone w krótkie łańcuszki, ułożone dość luźno. Boki walcowatej kolonii są złożone z komórek krótszych i skracających się coraz bardziej w miarę zwiększania odległości od podstawy. Pojawiają się też zarodniki, coraz liczniejsze ku wierzchołkowi kolonii. W wierzchołkowej partii kolonii komórki odznaczają się silnym pleomorfizmem — obok form wydłużonych i smukłych spotyka się postacie obrzmiałe, jajowate. W tej części kolonii najliczniej też występują zarodniki. W środkowej śluzowej komorze porozrzucane są luźno komórki przeważnie obrzmiałe i skrócone, rzadziej laseczkowate i zawierające zarodniki.

Obserwacje powyższe nad laseczką *949* nie zawsze są zgodne z wynikami otrzymywanymi przez innych badaczy.

Przede wszystkim forma, kształt, a wtórnie i wewnętrzna budowa kolonii zależna była, wbrew poglądowi Stössa (1955), od składu podłoża, a zwłaszcza od względnej ilości i rodzaju substancji węglowych.

Większe stężenie substancji zestalającej w pożywce miało, według Zikesa (1916) i Orsosa (1910), sprzyjać powstawaniu kolonii „wysokich". Pod tym względem laseczka *949* zachowuje się wprost odwrotnie: przy dużym stężeniu agaru postacie kraterowate są znacznie niższe i mniej typowe.

W budowie wewnętrznej kolonii laseczki *949* dostrzec można również pewne osobliwości. „Histologia" kolonii laseczek zarodnikujących była dotychczas badana tylko przez Hutchinsona (1907), Greene'a (1938) i Stössa (1955). Według Hutchinsona kolonie *B. subtilis* składają się z trzech warstw horyzontalnych, przy czym przetrwalnikowanie zachodzi głównie w warstwie górnej; warstwa środkowa zawiera formy involucyjne, zdegenerowane. Przedmiotem zainteresowania Greene'a były beztlenowe *Clostridium*, o zupełnie odmiennym typie wzrostu i kolonii. Stöss w koloniach laseczek znalazł trzy (u *B. subtilis*, *B. anthracoides* i *B. mesenteroides*) lub dwie (u *B. multifermentans* i *B. putrificans*) poziome warstwy. Zarodniki powstają, wedle jego obserwacji, w warstwie środkowej (u *B. anthracoides*) lub środkowej i górnej (u *B. subtilis*).

Kolonie laseczki *949* składają się również z trzech warstw:

a) Podstawowej, przylegającej do podłoża, zawierającej, jak się zdaje, komórki w stanie wegetatywnego rozmnażania.

b) Okrywowej — odpowiadającej błonce pokrywającej z zewnątrz kolonię. Warstwa ta składa się z komórek jeszcze rozmnażających się, lecz w częściach błonki bardziej oddalonych od podłoża przechodzących w stan przetrwalnikowania. W warstwie okrywowej przy wierzchołku kolonii bakterie masowo przechodzą w stan spoczynkowy (przetrwalniki), przypuszczalnie wskutek skąpego dopływu substancji odżywczych, dy-

fundujących z podłoża. W warstwie tej komórki są gęsto ułożone, często w łańcuszkach, w niewielkiej ilości substancji międzykomórkowej o charakterze śluzowatym.

c) Centralnej komory wypełnionej śluzem i stosunkowo nielicznymi, degenerującymi komórkami bakteryjnymi. Komora ta, w starszych koloniach o silnie pofałdowanej i pobrużdżonej błonce okrywającej, tworzy liczne boczne uchyłki, niekiedy zupełnie odizolowane. Uchyłki te na przekrojach dają obraz „plastrowaty", „kawernowaty", opisywany dokładnie w pracy Legroux i Magrou.

Oryginalna forma i budowa kolonii laseczki *949* zdaje się uwarunkowana jest przede wszystkim działaniem czynników środowiskowych.

Laseczka na powierzchni podłoża początkowo tworzy jednowarstwową lub parowarstwową błonkę (fot. 12) rozrastającą się odśrodkowo. W miarę upływu czasu starsze komórki środkowej części błonki wydzielają coraz większe ilości śluzu, który przenika między błonkę i podłoże. Warstwa wzrostowa mieści się głównie na obwodzie kolonii, gdzie szybko dzielące się komórki zwiększają stale powierzchnię błonki, uwypuklając wierzchołek kolonii. Jednocześnie śluz znajdujący się w powierzchniowych warstwach błonki, między ciasno ułożonymi komórkami i ich łańcuszkami, wysycha i twardnieje nadając błonce jej skórowatą konsystencję.

W starszych koloniach, wskutek dalszego powiększania powierzchni błonki kopulasto sklepionej nad podłożem oraz zmniejszenia objętości wysychającego śluzu, wierzchołek kolonii zapada się kraterowato, a jej boki ulegają silnemu pofałdowaniu.

Walcowata lub buławkowata postać kolonii powstaje pod wpływem ciśnienia gromadzącego się pod błonką śluzu, nie znajdującego ujścia na boki wskutek silnego przylegania do agaru brzeżnej partii kolonii. Świadczy o tym zależność formy kolonii od ułożenia płytki. Kolonie na płytkach ułożonych dnem na dół są niższe, kolonie na płytkach leżących dnem do góry (powierzchnią agaru ku dołowi) są znacznie wyższe. Na podłożu z glikozą przybierają postać zwisających kropli, niekiedy urywających się pod wpływem własnego ciężaru.

Zróżnicowanie funkcjonalne komórek wewnątrz kolonii jest wyraźne: strefa regeneracyjna na obrzeżu kolonii, strefa spoczynkowa rozwijająca się ku wierzchołkowi w okrywającej warstwie, strefa degeneracyjna w środkowej komorze śluzowej z nielicznymi komórkami, które wywędrowały tam, prawdopodobnie dzięki ruchowi własnemu, z strefy przyagarowej i okrywającej. Zróżnicowanie to jest jednak jedynie wynikiem różnic w warunkach środowiskowych (różny dostęp powietrza, substancji odżywczych, wysychania), a nie przejawem wewnętrznego zróżnicowa-

nia komórek. Wszystkie komórki, o ile są jeszcze zdolne do rozwoju, są równocenne i pluripotentne.

Oryginalna i złożona budowa kolonii jest natomiast wynikiem działania środowiska na zbiorowisko komórek, zdolnych do obfitego wydalania śluzu i odznaczających się określonym mechanizmem podziału i popodziałowego układu.

Można się zgodzić z Knaysim (1951), że kolonia bakteryjna jest „pewną dynamiczną całością", ale całością kształtowaną w pierwszym rzędzie przez warunki środowiskowe w sposób określany przez kilka podstawowych cech drobnoustroju (sposób podziału, forma zespołów komórkowych, stopień oligotrofii, stopień oporności na produkty własnego metabolizmu, ilość i rodzaj wydalanego śluzu).

Autorowie korzystają ze sposobności, aby wyrazić serdeczne podziękowanie panu prof. Żulińskiemu, panu drowi Szuperskiemu i pani Czyżewskiej z Zakładu Anatomii Patologicznej Wydziału Weterynaryjnego Wyższej Szkoły Rolniczej w Lublinie za cenne rady i wskazówki, oraz za zezwolenie na korzystanie z mikrotomów i wyposażenia Zakładu.

LITERATURA

Benecke W., 1912: Bau und Leben der Bakterien. Teubner Verlag, Leipzig.

Davidson J. I., 1948: Massive colony formation of *Bacterium Friedländeri* in the liver in agranulocytosis. *J. Path. Bact.*, **60** : 51.

Felsenreich G. und Trawiński A., 1916: Über die Bedeutung des Kolonietypus für die Bestimmung und Differenzierung der Bakterienarten der Ko'i--typhus-Gruppe. *Österreich. Sanitätswes.*, **28** : 1.

Fleck L. und Elster O., 1932: Zur Variabilität der Streptokokken. *Zentr. Bakter. I, Orig.*, **125** : 180.

Greene H. C., 1938: Colony organisation of certain bacteria with reference to sporulation. *J. Bact.*, **35** : 261.

Hutchinson H. B., 1907: Über Form und Bau der Kolonien niederer Pilze. *Zentr. Bakter. II*, **17** : 417, i 593.

Knaysi G., 1951: Elements of bacterial cytology. Colmstock Publ. Co., Ithaca N. Y.

Kořinek J., 1948: Mikrobiologie, Universum. Praha.

Kořinek J. and Pokorný V., 1951: Excretion of glucides in *Agrobacterium radiobacter*. *Bull. Int. Ac. Tcheque Sci. Cl. Sci. Math. Nat. Med.*, **52** : 73.

Legroux R. et Magrou J., 1920: État organisé des colonies bactériennes. *Ann. Inst. Pasteur*, **34** : 417.

Orsos F., 1910: Die Form des tiefligenden Bakterien- u. Hefekolonien. *Zentr. Bakter. I., Orig.*, **54** : 289.

Stöss B., 1955: Darstellung der Feinstruktur von Bakterienkolonien in Sagittalschnitt. *Zentr. Bakter. I, Orig.*, **162** : 386.

Zikes H., 1916: Über abnorme Kolonienbildung bei Hefen u. Bakterien. *Zentr. Bakter. II*, **46** : 1.

W. Kunicki-Goldfinger and *S. Rowiński*

SOME STUDIES ON THE STRUCTURE OF BACTERIAL COLONY

Summary

Strain of *Bacillus*, isolated from intestine of vole, formed of agar-media very characteristic colonies. The fully developed colony had a form of long nipple (phot. 2, 3), after longer incubation — of a small volcano (phot. 4, 5).

The development of these colonies on media with different concentrations of carbohydrates and agar (table I) was examined.

The colony consisted of external membranaceous layer and internal slime--chamber. The amount of slime excreted was influenced by kind and concentration of carbon source in nutrient medium. The relative excess of carbohydrate resulted in increase of slime-prodution.

The inner structure of the colonies was studied on microtome preparations: (phot. 6-12). It has been established that there is some differentiation among cells in the colony. The generative layer, containing normal rods often in different division stages, was found on the base of the colony. The membranaceous external layer consisted of intermingled rods and short chains of rods. In the upper part of this layer bacterial cells were shortened and great proportion of them sporulated. On top of the colony majority of cells were in different stages of sporulation. Some involution-forms (rounded, irregular long rods) were also detected.

The inner chamber was filled with slime and relatively small number of degenerated, morphologically changed cells.

The mechanism of development of the colony and the problem of differentiation of cells in it was discussed on the basis of results obtained.

Morfologia kolonii — *Bacillus* Nr 949

Fot. 1. Kolonia 11-godzinna. Widok skośny. 10 ×

Fot. 2 i 3. Kolonie 24-godzinne. Widok z boku 10 ×. Widoczny jest charakterystyczny kształ kolonii

Fot. 4. Kolonie „krateroware" po dłuższej inkubacji: a — widok z góry, b — widok z boku. Wielkość naturalna. Wierzchołek uległ zapadnięciu i wklęśnięciu tworząc krater

Fot. 5. Stara kolonia krateroware. Widok z góry. Na brzegu kolonii widoczna pierścieniowata podstawa wariantu *B*

Fot. 6. Przekrój strzałkowy 17-18 godzinnej kolonii. Błękit toluidynowy. 6 × 6

Fot. 7. Podobny przekrój przez brzeg kolonii. Tionina. Widoczna jest komora środkowa, zanikająca ku brzegowi kolonii

Fot. 8. Przekrój strzałkowy 19-godzinnej kolonii: a — tionina, 6 × 6, b — Legroux i Magrou, 24 × 6. Brzeg kolonii w większym powiększeniu: *bł* — błonka okrywająca, *k* — centralna komora śluzowa

Fot. 9. Przekrój strzałkowy 20-godzinnej kolonii. Tionina. 6 × 2

Fot. 10. Przekrój strzałkowy 24-godzinnej kolonii, a — błękit toluidynowy, 6 × 2, b — tionina. 6 × 6. Widoczna wielokomorowa budowa kolonii.

Fot. 11. Przekroje poprzeczne 24-godzinnej kolonii. Błękit toluidynowy. 6 × 2

Fot. 12. Młoda, płytkowa kolonia. Legroux i Magrou. 45 × 6

Morphology of colonies of *Bacillus* 949

Phot. 1. Upper view of 11-hours colony. 10 ×

Phot. 2 and 3. Colonies after 24-hours-incubation. Side view. 10 ×. Note the characteristic forms of colonies

Phot. 4. Old colonies having the form of craters. a — upper view, b — side view. 1 ×

Phot. 5. *B* - variant growing in the form of a ring around old crater-colony

Phot. 6-10. Sagittal sections of colonies of various age

Phot. 11. Cross section

Phot. 6. 10a and 11. Stained with toulidine blue

Phot. 7, 8a, 9 and 10b. Stained with thionine

Phot. 8b. and 12. Stained by method of Legroux and Magrou

Phot. 7. 17-18-hours of incubation. The margin of the colony

Phot. 8. 19-hours of incubation: *bł* — external, membronaceous zone of colony, *k* — central camera, containing slime and degenerative involutionary forms of bacilli

Phot. 6. 17-18-hours of incubation

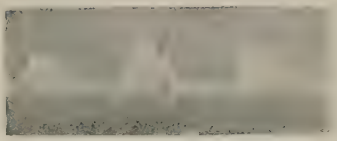
Phot. 9 20-hours incubation

Phot. 10. 24-hours of incubation. Note cavernous structure of the colony

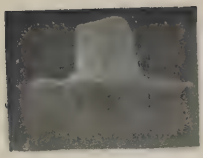
Phot. 11. Cross section of the colony after 24 hours of incubation

Phot. 12. Young colony in the form of a plate; stained by method of Legroux and Magrou. 45 × 6

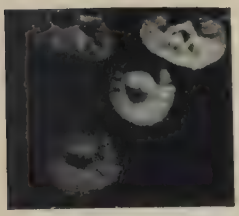
Fot. 1



Fot. 2

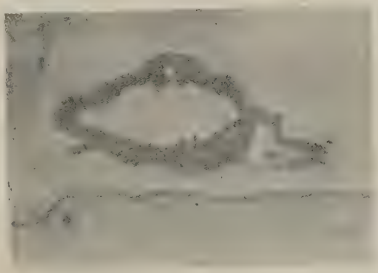


Fot. 3



Fot. 4a

Fot. 4b

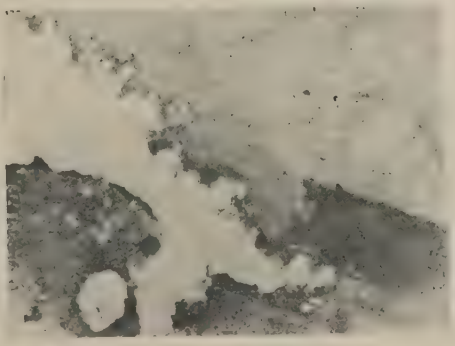


Fot. 6

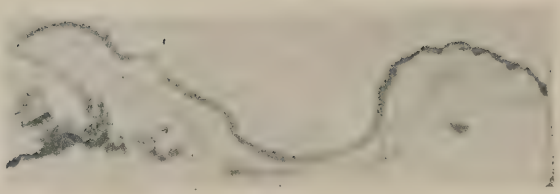
Fot. 5

Fot. 7

Fot. 8a



Fot. 8b

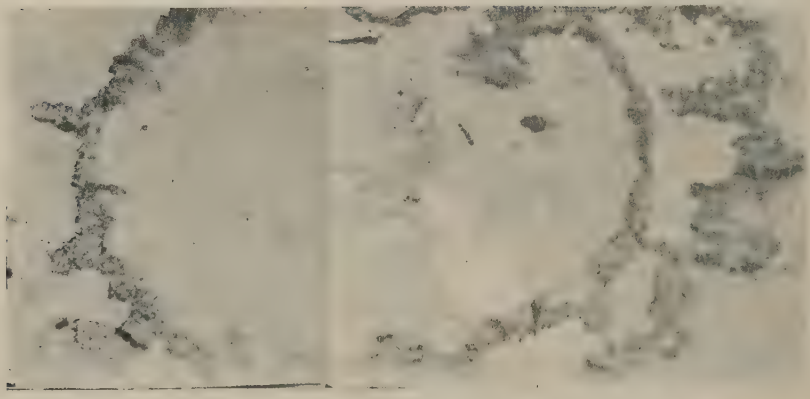


Fot. 9

Fot. 12

Fot. 10a

Fot. 10b



Fot. 11

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 331—344

W. Kunicki-Goldfinger, W. Drożański,
D. Błaszczak, J. Mazur i *J. Skibińska*

BAKTERIE JAKO POKARM PEŁZAKÓW

Z Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu i Zakładu Mikrobiologii Ogólnej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wpłynęło dnia 20 września 1957 r.

Znaczenie ekologiczne pełzaków glebowych, odżywiających się bakteriami, zależy nie tylko od ich ilości, ale w równej mierze od wybiórczego pożerania pewnych gatunków czy szczepów bakteryjnych przy równoczesnym nie atakowaniu innych.

Dobór pokarmu przez ameby spośród różnych szczepów bakterii glebowych oraz wpływ tych ostatnich na kiełkowanie cyst i wzrost pełzaków badano już wielokrotnie (Crump 1950, Imszeniecki 1947 a, b, Singh 1942, 1945, 1946, 1948, Franz 1951, Thornton i Crump 1952, Dudziak 1955).

W naszym Zakładzie Dudziak (1955) przebadała przydatność kilkunastu szczepów bakterii glebowych jako źródło pokarmu pełzaków. Stwierdziła przy tym, że wpływ danego szczepu bakterii na kiełkowanie cyst i wzrost ameb zależny jest od temperatury inkubacji.

Celem przedłożonej pracy jest zbadanie przydatności bakterii jako pokarmu pełzaków w zależności od przynależności systematycznej, wytwarzania pigmentów i wieku hodowli bakterii glebowych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono na pięciu typach drobnych pełzaków glebowych, znakowanych w naszym Zakładzie jako ameby *A*, *B*, *C*, *D* i *M*. Postacie wegetatywne wszystkich badanych pełzaków były identyczne, typy różniły się natomiast wyglądem cyst: typy *A* i *M* tworzyły cysty kuliste, *B* — kuliste pofałdowane, *C* — gwiazdowate, *D* — czworoboczne.

Pełzaki hodowano na agaroidzie, podając im jako pokarm *Aerobacter aerogenes*, w sposób opisany uprzednio (Dudziak 1954, 1955). W pew-

nych przypadkach posługiwano się bezbakteryjną hodowlą ameb, otrzymaną według metody Drożańskiego (1957).

Szczepy bakterii wyosobniono z gleby na podłożu agarowym z wyciągiem glebowym. Przechowywano je na agarach skośnych w temperaturze pokojowej.

Bliższą charakterystykę badanych szczepów oraz metody badania podano przy opisie odpowiednich doświadczeń.

WYNIKI

RÓŻNICE FIZJOLOGICZNE MIĘDZY TYPAMI AMEB

W celu przebadania chemotaksji pełzaków pod wpływem bakterii i ich szybkości poruszania się wykonano następujące doświadczenie:

Cysty spłukiwano z 11-godzinnej hodowli ameb na *A. aerogenes*. Zawiesinę cyst nanoszono rysą na powierzchnię płytek agaroidowych, po czym w odległości 0,75 cm od rysy umieszczano szereg kropli zawiesin różnych szczepów bakterii glebowych.

Płytki inkubowano w temperaturze 20-21° w komorach wilgotnych, obserwując kiełkowanie ameb i czas, w którym ameby dotarły do kropli zawiesiny bakteryjnej. Wyniki ilustruje tabela I.

Tabela I

Migracja ameb w zależności od pokarmu bakteryjnego
Effect of bacteria on migration of amoebae

Szczep ameby Strain of amoeba	Bakterie podane jako pokarm Bacterial food	Ilość szczepów bakteryjnych Number of bacterial strains Czas potrzebny do przebycia przez ameby odległości 0,75 cm, dni Time in which amoebae migrated over 0,75 cm space, days					
1		2	2,5	3	3,5	4	∞*
A	Bacterium	—	—	6	—	1	40
	Bacillus and diphteroids	—	—	—	—	—	11
	Cocci	—	—	4	—	—	8
B	Bacterium	34	5	6	1	—	—
	Bacillus and diphteroids	5	3	2	—	1	—
	Cocci	12	—	—	—	—	—
M	Bacterium	35	4	8	—	—	—
	Bacillus and diphteroids	1	3	3	1	—	3
	Cocci	10	1	1	—	—	—

* Cysty nie wykiełkowały lub po wykiełkowaniu pozostały w miejscu wsiewu.
No excystment or amoebae after excystment remained in the place of inoculation.

Widoczne jest, że cysty ameby *A* wykiełkowały jedynie w obecności nielicznych szczepów, natomiast cysty ameb *B* i *M* wykiełkowały prawie we wszystkich badanych przypadkach. Uderzająca jest również znacznie większa szybkość migracji ameb *B* i *M* niż *A*.

Dyfundujące przez agaroid produkty metabolizmu bakteryjnego tylko w wyjątkowych przypadkach pobudzają cysty ameb *A* do kiełkowania, a i w tych przypadkach chemotaktyczny ruch pełzaków jest bardzo powolny.

Zupełnie inny wynik otrzymuje się jednak wysiewając cysty ameb wprost na kroplę zawiesiny bakteryjnej. Żerność ameb *A*, ich zdolność wykorzystywania bakterii jako pokarmu i szybkość rozmnażania są nie mniejsze niż u ameb *B*, (tabele III i IV). Do kwestii tej powrócimy jeszcze przy dyskusji wyników.

WPŁYW BAKTERII NA KIEŁKOWANIE CYST

Już z zamieszczonej wyżej tabeli I wynika, że ekscystacja przebiega najłatwiej pod wpływem dyfundujących do agaroidu produktów metabolizmu ziarenkowców (ziarniaków i pakietowców), trudniej — pod wpływem pałeczek; bardzo słabo w obecności laseczek i dyfteroidów, a bardzo słabo lub wcale przy zetknięciu się z metabolitami promieniowców.

Dokładniej przebadano szybkość kiełkowania cyst ameby *B* w obecności kilkunastu szczepów bakteryjnych.

Na krążki agaroidowe nanoszono po kropli mniej więcej jednakowo gęstej zawiesiny różnych szczepów bakterii, otrzymanej ze spłuczyny 48-godzinnej hodowli na skośnym agarze odżywczym. Na bakterie nanoszono niewielkie ilości cyst (6-10) ameby *B* i określano przy pomocy bezpośredniej obserwacji mikroskopowej czas ich kiełkowania. Doświadczenie wykonano w pięciu równoległych powtórzeniach.

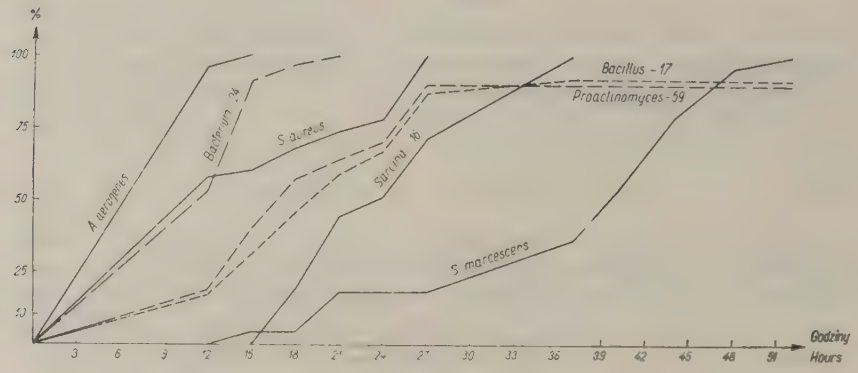
Rezultaty uwidacznia rysunek 1, w którym dla jasności obrazu pominięto krzywe dla pałeczek Nr *56* i *53*, pakietowca Nr *16* i laseczki Nr *41*, przebiegające podobnie jak odpowiednie krzywe na wykresie.

Na podkreślenie zasługuje znaczna szybkość kiełkowania cyst w obecności pałeczek i ziarenkowców. Wyjątkowo szybkie kiełkowanie cyst na *A. aerogenes* tłumaczyć można prawdopodobnie swoistą selekcją lub selekcją i przystosowaniem, wynikającymi z długotrwałej hodowli ameb *B* na tej bakterii *. Kiełkowanie cyst w obecności laseczek jest w przybliżeniu tak samo szybkie, lecz część cyst w ogóle nie kiełkuje. Jeszcze

* Wniosek ten znajduje potwierdzenie w możności przystosowania ameb do szybkiego i obfitego wzrostu w obecności *Mycobacterium pellegrini* po dłuższym pasażowaniu pierwotniaków na tej bakterii (Dudziak — osobista informacja).

wyraźniej widać to u promieniowca. Duży odsetek cyst w ogóle nie wykiełkował w obecności tej bakterii.

Wydaje się więc, że w obecności bakterii antagonistycznych w stosunku do pełzaków lub nieodpowiednich dla nich jako pokarm, pierwszy etap selekcji w obrębie populacji pełzakowej zachodzi jeszcze w stadium cysty. Osobniki słabsze nie przechodzą w postać wegetatywną, unikając w ten sposób wygłodzenia lub zatrucia, które stałyby się ich udziałem po wykiełkowaniu.



Rys. 1. Kiełkowanie cyst ameb w obecności różnych bakterii. Średnie wyniki z powtórzeń

Fig. 1. Excystment of amoeba in presence of various bacteria. Average results from parallel experiments

Trudno natomiast stwierdzić na podstawie powyższego doświadczenia, czy pigmenty bakteryjne rzeczywiście odgrywają zasadniczą rolę przy kiełkowaniu cyst. Ilość badanych tu szczepów była niewielka i jedynie kilka z nich wytwarzało barwik (ziarniak, pakietowiec, promieniowiec i pałeczka cudowna). Nawet silnie pigmentująca *Serratia marcescens* nie zwalniała kiełkowania, chociaż proces ten ulegał wyraźnemu zahamowaniu pod wpływem promieniowca wytwarzającego stosunkowo niewiele różowego barwika. Do problemu tego powrócimy jeszcze później.

WPŁYW BAKTERII NA WZROST AMEB

Zagadnienie to przebadano wstępnie na 65 szczepach glebowych (42 pałeczki, 5 laseczek, 3 dyfteroidy, 3 promieniowce, 9 ziarniaków i 3 pakietowce) stosując spłuczynę 24-godzinnej hodowli agarowej bakterii, zawiesiny cyst *B* i *M* oraz postępując identycznie jak w doświadczeniu nad migracją ameb.

Stopień namnożenia ameb w zależności od stanowiska systematycznego bakterii, podawanych jako pokarm, ilustruje tabela II.

Tabela II
Przydatność bakterii jako pokarm ameb w zależności od stanowiska systematycznego
The selection of bacterial food by soil amoebae

Stopień wzrostu ameb Growth of amoebae	Ilość szczepów bakterii Number of bacterial strains		
	pałeczki rods gramnegative	laseczki dyfteroidy bacilli diphteroids	ziarenkowce cocci
Ameba *M* — Amoeba *M*			
Ślad wzrostu Trace of growth	-	2	-
Słaby Slight	—	—	—
Średni Medium	3	7	—
Dobry Abundant	39	2	12
Ameba *B* — Amoeba *B*			
Ślad wzrostu Trace of growth	—	2	—
Słaby Slight	—	1	—
Średni Medium	2	5	—
Dobry Abundant	40	3	12

Widoczny jest bardzo dobry wzrost ameb na ziarenkowcach i olbrzymiej większości pałeczek. Słaby wzrost na laseczkach i dyfteroidach, a zupełnie nikły na promieniowcach.

Podobne w zasadzie wyniki otrzymano, badając pobieżnie wpływ 179 szczepów bakteryjnych (92 pałeczki, 9 dyfteroidów, 38 laseczek, 23 ziarenkowce, 4 promieniowce i 3 drożdżaki). Dokładniejszej analizie poddano wzrost czterech typów ameb (*A*, *B*, *C* i *D*) na 31 szczepach (15 pałeczek, w tym *A. aerogenes*, *Ps. aeruginosa* i *S. marcescens*, 4 laseczki, 5 dyfteroidów, 5 ziarenkowców i 2 promieniowce).

Dwie do trzech kropli gęstej zawiesiny bakterii, sporządzonej z 24-godzinnej (37°) i 7-dniowej (24°) hodowli, nanoszono na powierzchnię agaroidu; z kolei na zawiesinę bakterii nanoszono 10-20 cyst ameb czterech typów (*A*, *B*, *C* i *D*) spłukanych z 11-dniowej hodowli bezbakteryjnej (Drożański 1957).

Zależność namnażania się ameb od stanowiska systematycznego i pigmentotwórczości bakterii ilustrują tabele III i IV oraz rys. 2.

Okazuje się, że ani *P. aeruginosa* ani *S. marcescens* nie hamują wzrostu ameb. Bliższe rozpatrzenie obu tabel potwierdza uprzednio już wygłoszony nasz wniosek, że o przydatności bakterii jako pokarmu pełzaków decyduje przede wszystkim przynależność systematyczna bakterii. Silnie lub w pełni hamująco działają promieniowce (zarówno *Streptomyces* jak i *Proactinomyces*). Słabe rozmnożenie ameb obserwuje się też na laseczkach, z których żadna, co zasługuje na podkreślenie, nie tworzy barwnika. Spośród dyfteroidów najmniej odpowiednim podłożem dla wzrostu ameb są formy o barwniku zielonkawym.

Najobfitszy wzrost pełzaków otrzymuje się na ziarenkowcach i większości pałeczek i to bez względu na ich zdolność do produkcji pigmentu.

Różnice w działaniu poszczególnych bakterii na ameby stają się jeszcze wyraźniejsze w przypadku badania wpływu 7-dniowej zamiast 24-godzinnej hodowli bakterii. Obok promieniowców, które nadal nie dopuszczają do wzrostu pełzaków oraz laseczek silnie hamujących wzrost, działanie przeciwpełzakowe zaczynają wywierać żółtopigmentowane pałeczki oraz żółte i zielonkawe dyfteroidy. Zresztą i w obecności innych szczepów bakteryjnych (z wyjątkiem pakietowców) hodowanych w ciągu 7 dni przy 24° wzrost jest nieco słabszy niż przy użyciu hodowli 24-godzinnych.

Prawdopodobnie w ciągu długotrwałej hodowli, przy korzystniejszej temperaturze, bakterie gromadzą w podłożu i w komórkach więcej produktów metabolizmu szkodliwych dla ameb. Świadczy o tym fakt, że wzrost ameb ulega znacznemu zwolnieniu jeśli gęstość podanej im zawiesiny bakteryjnej jest zbyt duża. Tego rodzaju hamujące działanie zbyt gęstej zawiesiny zauważono u kilku szczepów badanych, na których, przy normalnie stosowanych w doświadczeniu warunkach, wzrost był zupełnie dobry.

Na szczególną uwagę zasługuje brak działania przeciwpełzakowego ze strony pigmentujących pałeczek (czerwonych i zielonych), dyfteroidów (czerwonych), ziarenkowców (żółtych, różowych i czerwonych), przy jednoczesnym wyraźnie antagonistycznym działaniu bezbarwnych laseczek.

Charakterystyczne jest, że zarówno pałeczki jak i dyfteroidy wytwarzające żółty pigment stają się bardzo silnie antagonistyczne po długotrwałej hodowli. (Uwaga ta nie odnosi się, jak już wspomniano, do pa-

Tabela III

Wzrost ameb na bakteriach glebowych

Growth of soil amoebae on bacterial food

Wiek hodowli bakterii Age of bacterial culture godzin hours	Szczep ameb Strain of amoebae	Stopień wzrostu ameb na bakteriach glebowych — Degree of growth of amoebae on bacterial food																
		Proactinomyces	*Bacillus*	Dyfteroidy Diphteroids				Pałeczki Gramnegative rods				Ziarenkowce Cocci			Pakietowce Sarcina			*Pseudomonas aeruginosa*
		p	u	g	y	r	Suma Total	u	y	r	Suma Total	u	p	Suma Total	y	r	Suma Total	
24h	A	0	2,25	2,5	3,0	3,0	2,8	3,0	3,0	3,5	3,0	4,0	2,5	3,0	4,0	4,0	4,0	3,0
	B	0	3,0	2,5	3,0	3,0	2,8	3,7	3,0	3,0	3,5	2,0	2,0	2,0	4,0	1,0	2,5	3,0
	C	0	1,75	2,0	3,0	3,0	2,6	3,1	3,0	3,5	3,15	4,0	2,5	3,0	4,0	4,0	4,0	4,0
	D	1,0	2,0	3,0	3,0	3,5	3,2	2,8	3,0	3,0	2,8	3,0	3,0	3,0	4,0	1,0	2,5	3,0
168h	A	0	1,75	1,0	1,5	3,0	1,6	2,8	0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	4,0	4,0	4,0	3,0
	B	0	1,75	0	1,5	3,0	1,2	2,4	0	3,0	2,3	3,0	3,0	3,0	4,0	4,0	4,0	3,0
	C	0	1,25	0	1,5	3,0	1,2	2,2	0	3,0	2,15	3,0	3,0	3,0	4,0	4,0	4,0	4,0
	D	0	2,5	0	1,5	3,0	1,2	2,1	0	3,0	2,0	3,0	2,5	2,7	4,0	4,0	4,0	3,0

Objaśnienia: u — bakterie nie wytwarzające pigmentu — bacteria unpigmented

Explanation: g — pigment zielonkawy — pigment greenish

y — „ żółty — „ yellow

p — „ różowy — „ pink

r — „ czerwony — „ red

Liczby oznaczają średni stopień wzrostu na szczepach danej grupy:

Numbers in the table give the average degree of growth on bacteria belonging to given group:

Skala: 0 — brak wzrostu — no growth

1 — do 30 ameb w polu widzenia
less than 30 amoebae in microscopic field

2 — 30—60 ameb w polu widzenia
30—60 amoebae in microscopic field

3 — 60—90 ameb w polu widzenia
60—90 amoebae in microscopic field

4 — ponad 90 ameb w polu widzenia
more than 90 amoebae in microscopic field

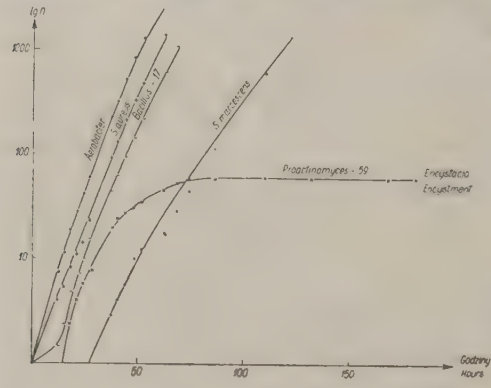
Tabela IV

Wzrost pełzaków na bakteriach bezbarwnych i pigmentowanych
Growth of soil amoebae on pigmented and not pigmented bacteria

Wiek hodowli bakterii Age of bacterial cultures growth-hours	Szczep ameb Strain of amoebae	Stopień wzrostu ameb na bakteriach bezbarwnych i pigmentowanych Degree of growth of amoebae on pigmented and not pigmented bacteria				
		Bakterie — Bacteria				
		bezbarwne	barwne — pigmented			
		Not pigmented	żółte yellow	czerwone red	różowe pink	zielonkawe greenish
24h	A	2,80	2,25	3,25	1,25	2,7
	B	2,5	3,3	2,7	1,0	2,7
	C	3,0	3,3	3,25	1,25	3,0
	D	3,1	3,25	3,0	2,5	3,1
168h	A	2,5	1,75	3,5	1,5	1,7
	B	2,25	1,75	3,25	1,75	1,0
	C	2,1	1,75	3,25	1,5	1,3
	D	2,3	1,75	3,25	1,25	1,0

Uwaga: Patrz tabela III
Note: See table III

kietowców). Wbrew zatem poglądom wielu badaczy — szczepy o żółtym barwniku okazują się nieodpowiednie jako pokarm dla ameb, jeśli uwzględni się dłuższy okres ich inkubacji.



Rys. 2. Wzrost ameb na różnych bakteriach. Patrz uwagi do rysunku 1
Fig. 2. Growth of amoebae on various bacteria. See note to fig. 1

Potwierdzenie naszego wniosku o zasadniczym znaczeniu pozycji systematycznej bakterii przy oddziaływaniu jej na wzrost ameb znaleźć można w rysunku 2.

Doświadczenie, na wynikach którego oparto ten rysunek, wykonane zostało tak samo jak doświadczenie nad kiełkowaniem cyst, opisane na str 333. Hamujące działanie promieniowca jest tu dobrze widoczne. Drugim zasługującym na uwagę fak-

tem, podkreślonym już przez Dudziak (1955), jest to, że niektóre bakterie, zwalniające początkowo rozmnażanie ameb (np *S. marcescens*), są mimo to odpowiednim dla nich podłożem. Po dłuższej obserwacji okazuje się, że wzrost ameb ilościowo jest normalny, a jedynie szybkość jego ulega zmniejszeniu.

WPŁYW NIEŻYWYCH BAKTERII NA WZROST AMEB

Bakterie (*A. aerogenes*) zabite działaniem podwyższonej temperatury (70-75°), 1,5-procentowym fenolem, 7,5-procentowym etanolem, 20-procentowym formolem, 22-procentowym kwasem trójchlorooctowym i 0,2 N ługiem sodowym, po starannym ich wypłukaniu i usunięciu środków bakteriobójczych, okazały się nieodpowiednim pożywieniem dla badanych pełzaków. W ich obecności nie obserwowano ani kiełkowania cyst, ani wzrostu ameb.

ROZWÓJ MIESZANEJ POPULACJI AMEB I BAKTERII

Tego rodzaju mieszane eksperymentalne populacje badała już Cutler (1923).

W naszych doświadczeniach jako środowisko użyto wyjałowionej w autoklawie (1,5 atmosfery, 45 minut) gleby ogrodowej, rozdzielonej w ilości po 500 g do litrowych słoi szklanych. Wilgotność gleby utrzymywano stale na poziomie 50% pojemności wodnej, *pH* gleby (po sterylizacji) wynosiło ca 7,0.

Jako składowe sztucznej populacji użyto ameby *M* z hodowli na *A. aerogenes* i laseczkę Nr *3*, wyosobnioną z gleby użytej do doświadczeń.

Eksperyment wykonano w sześciu kombinacjach. W każdej kombinacji mieszano starannie z glebą: w I — tylko zawiesinę laseczek, w II — zawiesinę laseczek i *A. aerogenes*, w III — zawiesinę laseczek, po czym na powierzchnię gleby wylano zawiesinę cyst ameb, IV — zawiesinę laseczek i cyst ameb, V — zawiesinę laseczek, po tygodniowej zaś inkubacji dodatkowo zawiesinę cyst ameb, VI — tylko zawiesinę cyst.

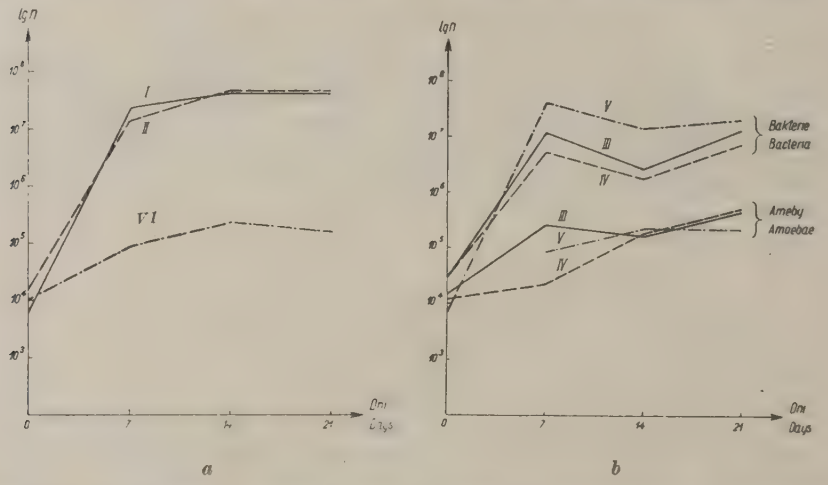
Inkubację prowadzono w temperaturze 18-20°.

Na początku eksperymentu oraz po 7, 14 i 21 dniach pobierano jałowym korkoborem próbę z całej głębokości naczynia; po wymieszaniu odważano 1 g gleby, sporządzano odpowiednie rozcieńczenia i wysiewano je na płytki agarowe w celu obliczenia ilości bakterii. Ameby liczono w tych samych terminach według zmodyfikowanej metody (Singh 1942, Brzezińska-Dudziak 1954).

Rezultaty tych badań ilustruje rys. 3.

Z wykresu wynika, że stan względnej równowagi między dwoma składnikami mieszanej populacji stosunkowo najłatwiej zostaje osiągnię-

ty, gdy uprzednio zezwoli się bakteriom na rozmnożenie w glebie a dopiero potem (po 7 dniach inkubacji) doda się cysty ameb (krzywa V). Jeśli natomiast środowisko zasiedlić od razu stosunkowo dużą ilością „drapieżców" w postaci ameb — rozwój obu populacji jest wyraźnie zahamowany (krzywa IV). Widoczne jest to również przy porównaniu krzywych V i III. Przy wysianiu cyst ameb na powierzchnię gleby,



Rys. 3a i 3b. Wzrost bakterii i ameb w jedno- i dwugatunkowych hodowlach glebowych. I — same laseczki, II — laseczki + *A. aerogenes*, III — Bacillus zmieszany z glebą; ameby wysiane na powierzchnię, IV — laseczki i ameby wymieszane z glebą, V — laseczki wymieszane z glebą; ameby dodane po 7 dniach inkubacji, VI — same ameby

Fig. 3a and 3b. Growth of bacteria and amoebae in one and two-membered cultures in sterile soil. I — Bacilli alone, II — *Bacillus* + *A. aerogenes*, III — Bacilli mixed with soil; amoebae cysts inculated on the surface of soil. IV — Bacilli and amoebae mixed with soil, V — Bacilli mixed with soil; amoebae added after 7 days of incubation, VI — Amoebae alone

w pierwszym okresie obserwacji stwierdza się dość silne namnażanie zarówno ameb jak i bakterii, po którym następuje spadek ilości obu komponentów i ponowny wzrost w trzecim okresie (krzywa III).

DYSKUSJA WYNIKÓW

Opisane powyżej doświadczenia wskazują, że interpretacja wszelkich obserwacji nad wpływem bakterii na wzrost ameb wymaga dużej ostrożności i uwzględnienia wielu czynników zwykle nie docenianych przez badaczy. W poprzedniej pracy (D u d z i a k 1955) wykazano wpływ tem-

peratury, w jakiej przeprowadza się eksperymenty, i metody badania wzrostu ameb na interpretację wyników. Obecnie okazało się, że zawsze należy uwzględnić również właściwości badanych pierwotniaków, a zwłaszcza ich zdolność do migracji i wrażliwość na bodźce chemotaktyczne, a ponadto fazę wzrostową, w jakiej znajdują się testowe bakterie.

Zdaje się, że po uwzględnieniu tych czynników obraz wybiórczości pokarmowej ameb ulegnie pewnej modyfikacji.

Przede wszystkim pełzaki nie odżywiają się i nie rosną na bakteriach nieżywych, lub raczej na bakteriach zabitych przy pomocy środków denaturujących białko i zmieniających charakter powierzchni komórek bakteryjnych.

Dalej — o przydatności bakterii jako pokarmu ameb decyduje w pierwszym rzędzie skład chemiczny i budowa komórki, odmienna u różnych grup systematycznych. Zupełnie nieodpowiednie jako pokarm są promieniowce. Nieco lepszym podłożem dla ameb są laseczki i dyfteroidy glebowe. Najodpowiedniejszym — pałeczki i ziarenkowce.

Zdolność do tworzenia pigmentu, wbrew poglądowi głoszonemu przez Singha (1942) i Imszenieckiego (1947 a, b), zdaje się w stosunkowo małym stopniu wpływać na przydatność bakterii jako pokarm pełzaków. Ciekawe jest również, że bakterie żółto pigmentowane i to zarówno dyfteroidy jak i pałeczki hamują wzrost ameb, jeśli użyć do eksperymentu starych (7-dniowych) hodowli bakterii. Dotychczas właśnie bakterie żółto pigmentowane uchodziły za najodpowiedniejsze jako pokarm spośród wszystkich wytwarzających barwiki (Singh 1942).

Prawdopodobnie, jak wynika z naszych doświadczeń, najodpowiedniejszym pokarmem dla pełzaków jest mikroflora zymogenna gleby. Wyjątek stanowią tu laseczki zarodnikujące, których mniejsza przydatność jako pokarmu dla pełzaków może wynikać z charakteru ich osłon komórkowych (błona, a zwłaszcza warstwa śluzu o specyficznym składzie i strukturze). Natomiast flora autochtoniczna obejmująca promieniowce, mykobakterie * i dyfteroidy jest stosunkowo oporna na atak pełzaków.

Oczywiście nie wykluczone, że powyższy obraz jest ważny jedynie w odniesieniu do badanych przez nas drobnych pełzaków, dających się izolować na podłożach stałych i pasażowanych na *A. aerogenes*. Wprawdzie badania Singha (1945) wskazują, że wybiórczość pełzaków w stosunku do pokarmu jest mniej więcej jednakowa u różnych typów, ale powyższe zastrzeżenie dotyczy również i jego wyników, wobec posługiwania się przezeń podobną metodą.

* Małą przydatność mykobakterii jako pokarmu ameb stwierdziła Dudziak (osobista informacja).

Stopień namnożenia się pełzaków w glebie i rola, jaką odgrywają w regulacji biocenozy gleby, zależeć będą jednak nie tylko od ich wybiórczości pokarmowej, ale w równej mierze od względnych ilości bakterii stanowiących pokarm. Zbyt duża ilość ameb w stosunku do ilości dostępnego pokarmu może sama stać się czynnikiem ograniczającym a nawet cofającym ich wzrost, jak ilustruje to nam ostatnie doświadczenie.

Możliwe, że jest to jedna, choć na pewno nie jedyna przyczyna nie dających się wyjaśnić wahań w ilości pełzaków i bakterii w doświadczeniach w Rothamsted (Cutler, Crump i Sandon, 1923). Dodatkowym czynnikiem mogą być i niewątpliwie częstokroć są procesy czynnego antagonizmu ze strony grzybów i bakterii patogennych w stosunku do pełzaków (Duddington 1955, Drożański 1956).

LITERATURA

Brzezińska-Dudziak B., 1954: Oznaczanie ilości ameb w glebie według zmodyfikowanej metody Singha. *Acta Microbiol. Polon.*, **3** : 121.

Crump L. M., 1950: The influence of the bacterial environment on the excystment of amoeba from soil. *J. gen. Microbiol.*, **4** : 16.

Cutler D. W., 1923: The action of Protozoa on bacteria when inoculated into sterile soil. *Ann. appl. Biol.*, **10** : 137.

Cutler D. W., Crump L. M. a. Sandon Al., 1923: według Kitching, 1957.

Dudziak B., 1955: Kiełkowanie i wzrost ameb w zależności od pokarmu bakteryjnego. *Acta Microbiol. Polon.*, **4** : 115.

Drożański W., 1956: Fatal bacterial infection in soil amoebae. *Acta Microbiol. Polon.*, **5** : 315.

Drożański F., 1957: Bezbakteryjna hodowla ameb (praca nie opublikowana).

Duddington C. L., 1955: Fungi that attack microscopic animals. *Botan. Rev.*, **21** : 377.

Franz H., 1951: État de nos conaissances sur la microfaune du sol. *Ann. biol.*, **27** : 241.

Imszeniecki A. A., 1947 a: Ekołogija pigmientnych mikroorganizmow. II Antagonisticzeskoje diejstwije pigmientow. *Mikrobiołogija*, **16** : 3.

Imszeniecki A. A., 1947 b: Antagonisticzieskoje diejstwije niekotorych mikroorganizmow na mikrofłoru poczwy. *Mikrobiołogija*, **16** : 403.

Kitching J. A., 1957: Some factors in the life of free-living Protozoa. *Symp. Soc. gen. Microbiol.*, **7** : 259.

Singh B. N., 1942: Selection of bacterial food by flagellates and amoebae. *Ann. appl. Biol.*, **29** : 18.

Singh B N., 1945: The selection of bacterial food by soil amoebae, and the toxic effects of bacterial pigments *Brit. J. exp. Path.*, **20** : 316.

Singh B. N., 1946: A method of estimating the number of soil Protozoa, especially amoebae based on their differential feeding on bacteria. *Ann. appl. Biol.*, **33** : 112.

Singh B. N., 1948: Studies on giant amoeboid organisms. *J. gen. Microbiol.*, **2** :

Thornton H. G. & Crump L. M., 1952: Micropredators in soil. *Rep. Rothamsted exp. Sta.*, : 164.

W. Kunicki-Goldfinger, W. Drożański, D. Błaszczak, J. Mazur and *J. Skibińska*

BACTERIAL FOOD OF SOIL AMOEBAE

Summary

In continuation of previous work (Dudziak 1955, Drożański 1956) growth of soil amoebae on different types of soil bacteria was studied.

It was shown that different soil amoebae were excysting and multiplying at different rates. These differencies were probably due to different degree of sensitivity of cysts to products of bacterial metabolism diffunding through the agar and to different migration-power of various strains of amoebae (Table I).

Excystment of amoebae was observed in presence of all tested bacteria. The proportion of cysts that are hatching and the rate of excystment depend yet on kind of bacteria. In this connection test bacteria could be grouped in three types:

a) Micrococci, sarcinae and almost all gram-negative rods (chromogenic and unpigmented) — in presence of which all cysts are hatching after few hours of incubation.

b) Some chromogenic bacteria (e. g. *Serratia marcescens*) — initiating excystment in all amoeba cells but retarding this process.

c) Sporeforming aerobic bacilli, soil diphteroids, and *Proactinomyces* — the excystment in observable already after short incubation but some proportion of cysts is unable to hatch even after very prolonged incubation (table II, fig. 1).

Contradictory to observations of Singh (1942) and Imszeniecki (1947 a, b) majority of chromogenic bacteria (*Ps. aeruginosa* including) have no detrimental effect on the excystment of amoebae. In few cases only some retardation of hatching was detected.

Growth of amoebae on different soil bacteria were studied in many experiments. The results (table III, fig. 2) suggest that the most favourable for the active stage of amoebae are sarcinae, cocci and gram-negative rods (chromogenic and nonchromogenic as well). Growth rate in presence of bacilli and diphteroids is almost as high as in presence of rods, but the lag-phase is prolonged.

Very slow growth was found on *Proactinomyces* and active amoebae encysted early, as though starved.

Observations show also that suitability of bacteria as a food for amoebae is influenced to a great extent by the age of bacterial cultures used in experiments. Yellow pigmented rods, cocci and yellow or greenish pigmented diptheroids were a good substrat for growth of amoebae when taken from 24-hours cultures. Culturing of these strains for seven days resulted in inhibition of growth of amoebae, when bacteria were given as food.

This effect was not observed with other chromogenic bacteria (table IV).

The powers of bacteria of reducing the growth rates of amoebae relay on systematic differencies rather than on the ability to form pigments. All sporeforming non-chromogenic bacilli supported growth at a reduced rate. All gram-negative rods and cocci — chromogenic and nonchromogenic — gave good growth.

The evidence leads us to conclusion that the selection of food in soil amoebae is probably by size of bacteria, physical characteristics of their surfaces (e. g. *Proactinomyces*, diphteroids, bacilli) and only to some extent by chemical differencies between bacteria (e. g. pigment production). It was also shown that better

food for amoebae is to be found among zymogeneous microflora of soil (gram-negative rods including *Pseudomonas*, sarcinae, cocci) than among autochtonic soil-bacteria (diphteroids and actinomycetes). The only exception are sporeforming bacilli.

In the last experiment a predator-pray relationship was studied in two-membered cultures. Amoebae were fed on *Bacillus sp.* (No 3), isolated from soil, in sterile soil cultures. (In reality the protozoa were fed on bacilli and small number of cells of *Aerobacter aerogenes* on which amoebae was cultured).

The control of bacilli by amoebae was demonstrated (fig. 3). The number of predators (amoebae) growing in these cultures was on the other side controlled by amount of food (number of bacteria). The increase in numbers of amoebae was checked by decrease in viable count of bacteria, due to extermination. This caused to appear weaves of growth of both organisms.

All these problems are subjects of further research.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 345—353

J. Duda i *H. Kaszubiak*

BADANIA NAD DZIAŁANIEM STREPTOMYCYNY W WARUNKACH GLEBOWYCH

Z Katedry Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu

Wpłynęło dnia 15 sierpnia 1957 r.

W pracy poprzedniej autorzy (1957) badali wpływ różnych podłoży na efekt antybiotyczny badanych szczepów promieniowców oraz wpływ szczepienia gleby dużymi dawkami silnie antybiotycznego szczepu *Streptomyces griseus*. Na podstawie otrzymanych wyników doszli do wniosku, że obecność w glebie potencjalnie antybiotycznych drobnoustrojów nie pozwala jeszcze wykazać zjawiska antybiozy w glebie. Nawet w przypadku gdy drobnoustroje wytwarzają w określonych warunkach ekologicznych antybiotyk, efekt ich działania może być ograniczony, bądź zupełnie niedostrzegalny, na skutek inaktywacji zachodzącej w środowisku glebowym.

W pracy niniejszej badano bezpośredni efekt antybiotyczny wprowadzonej do kilku typów gleb streptomycyny.

PRZEGLĄD LITERATURY

Problem wytwarzania antybiotyków oraz ich inaktywacji w glebie był przedmiotem nielicznych badań. Do najdawniejszych należą badania Sandforda i Broadfoota (1931), którzy wykazali antagonistyczne działanie niektórych mikroorganizmów oraz wyciągów z ich hodowli na patogenny grzyb *Ophiobolus graminis* w wyjałowionej glebie. Waksman i Woodruff (1942) sporządzili eterowe wyciągi z gleby, wykazujące silne działanie bakteriostatyczne. Aktywność tych wyciągów po wprowadzeniu do gleby silnie spadała. Hessayon (1951) stwierdził wytwarzanie trychotecyny przez *Trichothecium roseum* w wyjałowionej glebie wzbogaconej składnikami odżywczymi. Brian, Wright, Stubbs i Wace (1951) wykazali, że trwałość gryzeofulwiny jest znacznie większa w glebie wyjałowionej niż w glebie niejałowej. Do analogicznych wniosków doszli w swych badaniach Gregory, Allen,

Riker i Peterson (1951), Siminoff i Gottlieb (1951), Gottlieb i Siminoff (1952), Martin i Gottlieb (1952) oraz Gottlieb, Siminoff i Martin (1952). Wyżej cytowani autorzy zauważyli ponadto, że drobnoustroje antybiotyczne, nawet w jałowej glebie, tracą zdolność do wytwarzania poszczególnych antybiotyków. Stwierdzili między innymi, że drobnoustroje, które na podłożach laboratoryjnych wytwarzały streptomycynę, aureomycynę, terramycynę, chloramfenikol, klawacynę i aktydion, w glebie jałowej produkowały jedynie chloramfenikol, po wzbogaceniu zaś gleby mączką sojową również i aktydion.

Większą stabilność antybiotyków w glebach jałowych można by tłumaczyć osłabieniem adsorbcyjnych właściwości gleby pod wpływem wyjaławiania ciepłem oraz zmniejszeniem jej aktywności chemicznej na skutek utlenienia wielu związków mineralnych i zahamowania procesów biologicznych.

BADANIA WŁASNE

Przebadano wpływ streptomycyny na mikroflorę trzech różnych typów gleby: a) gleby piaszczystej leśnej, b) mady, c) silnie zmineralizowanego torfu.

Do badań użyto siarczanu streptomycyny produkcji radzieckiej. Charakterystykę gleboznawczą uwzględnionych w badaniach gleb podano w tabeli I.

Tabela I

Charakterystyka gleb
Characteristics of examined soils

Rodzaj gleby Kind of soil	Kwasowość czynna Acidity	Kwasowość wymienna Exchange acidity	Zawartość związków organicznych w suchej masie w % Organic compounds in dry matter per cent	Pojemność wodna w % Water capacity per cent	Woda hygroskopowa w % Water, hygroscopic per cent
Leśna Forest soil	5,5	4,0	2,1	23,62	0,49
Mada Alluvial soil	7,5	6,9	5,5	48,33	2,28
Torf Peat	7,7	7,05	12,3	51,60	2,82

W następnym doświadczeniu oznaczono wrażliwość mikroflory badanych gleb na streptomycynę. W tym celu sporządzono z każdej gleby

odpowiednie rozcieńczenia, które wysiano na pożywki agarowe na płytkach Petriego. Do posiewów użyto pożywki sporządzonej na wodzie wodociągowej z dodatkiem 2% agaru, 0,1% peptonu, 0,1% sacharozy, 0,1% K_2HPO_4, 0,03% $MgSO_4$, 0,03% NaCl. Odczyn pożywki ustalono na *pH* 7-7,2.

Posiewy z każdej gleby wykonano w pięciu powtórzeniach płytkowych, w sześciu kombinacjach: bez dodatku streptomycyny (kontrola) oraz w obecności pięciu wzrastających dawek streptomycyny (1γ, 5γ, 10γ, 50γ i 100γ na 1 ml podłoża). Rozcieńczenia gleby sporządzano metodą homogenizacji (Duda, Głębocki-Pędziwilk i Malińska, 1957). Kolonie liczono po 3 dniach hodowli w termostacie przy temperaturze 28°. Kolonie wyrosłe na płytkach z dodatkiem streptomycyny kwalifikowano jako oporne na streptomycynę.

Wyniki doświadczenia przedstawiono w tabeli II.

Tabela II

Wrażliwość mikroflory badanych gleb na różne stężenia streptomycyny
The susceptibility of soil microflora to different concentrations of streptomycin

Stężenie streptomycyny w γ/ml pożywki Concentration of streptomycin γ per 1 ml	Ilość mikroflory (w tys.) na 1 g gleby Number of microorganisms per 1 g of the soil					
	gleba leśna forest soil	% opornych per cent resistant	mada alluvial soil	% opornych per cent resistant	torf peat	% opornych per cent resistant
Kontrola (o) Control (o)	960	100	1 224	100	6 728	100
1	138	14,4	173	14,1	1 362	20,2
5	89	9,3	70	5,7	490	7,4
10	42	4,4	70	5,7	300	4,5
50	19	2,0	94	7,7	195	2,9
100	25	2,5	104	8,6	294	4,4

Wyniki doświadczenia wskazują, że ilość drobnoustrojów glebowych wrażliwych na streptomycynę jest bardzo duża. Już przy dawce 1 γ streptomycyny na 1 ml podłoża wynosi 79,8% drobnoustrojów w glebie torfowej, 85,6% w glebie leśnej i 86,9% w madzie. Procent ten jeszcze wzrasta przy zwiększaniu dawek streptomycyny. Wrażliwość saprofitycznej mikroflory glebowej jest nie mniejsza a nawet większa niż wrażliwość wielu przebadanych szczepów bakterii chorobotwórczych (według Kuryłowicza i Ślopka, 1950). Wykazano też, że wrazliwość mikroflory badanych trzech różnych typów gleby jest mniej więcej taka sama. Stwierdzono też, że odsetek form opornych na najwyższe stosowane stężenie streptomycyny (100 γ 1 ml) jest nieco większy niż procent opor-

nych na 50 γ/1 ml. Podobne zjawisko zauważyli w badaniach nad chloramfenikolem Voureka (1952) oraz Gottlieb i Siminoff (1952).

Drugie doświadczenie przeprowadzono następująco:

z większych próbek powietrznosuchej gleby, przesianej przez sito (oczka — Ø 3 mm), odważono porcje po 25 g i umieszczono je w stożkowych kolbach o pojemności 100 ml. Dla każdej gleby ustalono 6 kombinacji, po 9 kolb w każdej. I kombinacja (bez streptomycyny) służyła jako kontrola, do 5 następnych dodano streptomycynę w ilości 10, 30, 100, 250 i 1000 γ na 1 g powietrznosuchej gleby. W wyniku wstępnych badań dodano następnie kombinację VII, w której dawka streptomycyny wynosiła 1050 γ w serii z madą, a 2000 γ w serii z glebą torfową. Wilgotność gleb ustalono na poziomie 60% pojemności wodnej. Kolby z glebą inkubowano przy temperaturze 28°. Ubytek wody w kolbach uzupełniano dodając co 2 dni jałową wodę wodociągową. Po 20 godzinach oraz po 4 i 11 dniach wyjmowano po 3 kolbki z każdej kombinacji, zawartość ich łączono i mieszano, po czym pobierano dziesięciogramowe próbki reprezentacyjne do ilościowej analizy na ogólną ilość drobnoustrojów. Przy analizie postępowano jak w doświadczeniu poprzednim.

Wyniki zestawiono w tabeli III.

Wyniki wskazują, że ilość drobnoustrojów w glebie po dłuższej inkubacji w obecności streptomycyny jest tylko nieznacznie mniejsza niż w kontroli. Ilość drobnoustrojów w madzie i w glebie torfowej, nawet w obecności 1000 lub 2000 γ streptomycyny na 1 g gleby, nie jest mniejsza niż w kontroli już po 4 dniach inkubacji, a tylko nieznacznie mniejsza po 20 godzinach.

Wobec stwierdzonej w doświadczeniu uprzednim dużej wrażliwości mikroflory badanych gleb na streptomycynę, brak działania antybiotyku w glebie należy tłumaczyć jego inaktywacją oraz w pewnym stopniu kompensacyjnym wzrostem drobnoustrojów. O inaktywacji streptomycyny wskutek adsorpcji jej na koloidach glebowych świadczyć może znacznie wyraźniejszy efekt antybakteryjny streptomycyny wprowadzonej do mineralnej gleby leśnej, zawierającej znacznie mniej substancji organicznej i w słabym stopniu shumifikowanej. Charakterystyczny jest również fakt krótkotrwałości efektu antybakteryjnego wprowadzanej streptomycyny w glebie leśnej. Wskazywałoby to na postępującą inaktywację biologiczną streptomycyny nieinaktywowanej bezpośrednio na drodze fizycznej i chemicznej, bądź też na wtórne opanowanie środowiska przez drobnoustroje oporne na streptomycynę. Godny uwagi jest również fakt wtórnego zwiększenia ilości drobnoustrojów po chwilowym jej obniżeniu przy dawkach 10, 30 i 100 γ streptomycyny na 1 g gleby leśnej. Przypuszczalnie zjawisko to jest analogiczne do znanych procesów obserwowanych przy częściowej sterylizacji gleby.

W madzie zahamowanie wzrostu drobnoustrojów zaobserwowano dopiero przy dawkach streptomycyny większych niż 1000 γ na 1 g gleby, w glebie torfowej w dawce nieco większej (2000 γ/1 g). Można by to

Tabela III

Wpływ streptomycyny na ilość drobnoustrojów w glebie

Influence of streptomycin on the number of microorganisms in soil

Czas inkubacji Incubation period	Ilość drobnoustrojów (w tysiącach na 1 g suchej masy gleby) rosnących w obecności streptomycyny The number of microorganisms (thousands per 1 g of a. dry soil) that formed colonies in the presence of streptomycin							
	γ streptomycyny na 1 g gleby — γ of streptomycin per 1 g of soil							
	0	10	30	100	250	1000	1050	2000
	gleba leśna — forest soil							
20 godzin hours	4 623	2 695	1 780	989	797	49		
4 dni days	2 071	2 695	2 685	1 508	957	524		
11 dni days	2 890	5 584	4 359	4 571	2 349	2 073		
	mada — alluvial soil							
20 godzin hours	20 638	22 773	22 061	22 046	24 908	21 350	15 200	
4 dni days	19 642	19 499	20 211	18 147	17 934	17 930	18 500	
11 dni days	33 388	33 540	33 110	33 413	32 990	32 850	32 105	
	torf zdegradowany — peat soil							
20 godzin hours	23 953	24 104	23 650	24 467	22 361	22 437		11 350
4 dni days	17 734	18 520	18 694	16 422	15 444	16 832		16 000
11 dni days	9 761	9 350	8 850	9 100	9 239	9 596		9 812

tłumaczyć między innymi tym, że pojemność adsorpcyjna mady zostaje wysycona przy dawce 1000 γ streptomycyny, gleby torfowej zaś między 1000 a 2000 γ. Obserwowany w tych przypadkach efekt byłby wówczas powodowany tylko przez część dawki streptomycyny, która nie uległa zaadsorbowaniu lub zinaktywowaniu.

Opierając się na stwierdzeniu Siminoffa i Gottlieba (1951), że inaktywowanie streptomycyny zachodzi na skutek jej zaadsorbowania na ujemnie naładowanych koloidach mineralnych i organicznych gleby, przeprowadzono badania nad wpływem odczynu gleby na dzia-

łanie streptomycyny. Zakwaszenie gleby zmniejsza jej pojemność adsorpcyjną, zalkalizowanie natomiast działa odwrotnie. Przyjmując, że jednym z czynników inaktywujących streptomycynę w glebie jest jej adsorpcja na cząsteczkach koloidów, można spodziewać się, że zmniejszenie pojemności adsorpcyjnej gleby przez obniżenie *pH*, bądź całkowita koagulacja koloidów przez obniżenie odczynu poniżej ich punktu izoelektrycznego, spowoduje uwolnienie do roztworu wolnych cząsteczek streptomycyny. Z przypuszczeniem tym zgodne są wyniki uzyskane w poprzednim doświadczeniu z glebą leśną. W glebie tej, odznaczającej się niską wartością adsorpcyjną, hamujące działanie obserwowano nawet przy stosunkowo małych dawkach streptomycyny.

W doświadczeniu nad wpływem *pH* na aktywność streptomycyny w glebie uwzględniono tylko największe dawki z poprzedniego doświadczenia (1050 γ/1 g mady, 2000 γ/1 g gleby torfowej oraz 100 γ/1 g gleby leśnej). Wyniki odczytywano po 20 godzinach. Odczyn badanych gleb nastawiano przy pomocy roztworu 0,2 N HCl i 0,25 N Na_2CO_3. Doświadczenie przeprowadzono identycznie jak poprzednie.

Wyniki doświadczeń zestawiono w tabeli IV.

Wyniki doświadczenia potwierdzają zależność między odczynem gleby a efektem antybiotycznym streptomycyny. Zależność ta jest szczególnie wyraźna na glebie leśnej i madzie. Również w glebie torfowej odsetek drobnoustrojów rosnących w obecności antybiotyku w miarę zakwaszania środowiska maleje, spadek ten jest jednak nieznaczny. Zalkalizowanie mady i gleby leśnej spowodowało zwiększenie ilości drobnoustrojów rosnących w warunkach doświadczenia. Jedynie na glebie torfowej, przy alkalizacji procent drobnoustrojów rosnących w obecności streptomycyny spadł, aczkolwiek bezwzględna ich ilość znacznie wzrosła. Przyczyną tego jest wielokrotny wzrost ogólnej ilości drobnoustrojów przy zalkalizowaniu gleby do *pH* 8,9. Przyczyn tak znacznego wzrostu ogólnej ilości mikroflory nie badano. Być może, że jest to skutek zmiany struktury badanej gleby torfowej, spowodowanej rozpuszczeniem jej frakcji humusowej.

DYSKUSJA WYNIKÓW I WNIOSKI

Przedstawiona praca stanowi wstępną część podjętych przez autorów badań nad problemem antybiozy w glebie. Przeprowadzone doświadczenia nad wpływem streptomycyny na ogólną ilość mikroflory gleby miały na celu uzyskanie wskazówek do dalszych szczegółowych badań powyższego problemu.

Na podkreślenie zasługuje brak działania antybiotycznego nawet bardzo dużych dawek streptomycyny, sięgających w przypadku gleb organicznych (gleba murszowa i mada) aż 1000 γ na 1 g gleby. W warun-

Tabela IV

Ilość drobnoustrojów (w tys. na 1 g suchej gleby) w glebie w zależności od *pH* i stężenia streptomycyny.
Inkubacja 20-godzinna

Effect of streptomycin and of *pH* of soil on the number of microorganisms (in thousands per 1 g of a. d. soil).
Incubation — 20 hours.

gleba leśna — forest soil

Stężenie streptomycyny na 1 g gleby Concentration of streptomycin per 1 g of soil	*pH* 5,5		7,7		7,9		8,9	
	Ilość number	% per cent	Ilość number	% per cent	Ilość number	% per cent	Ilość number	% per cent
0	4 608	100	10 906	100	24 272	100	28 536	100
100 γ	1 004	21,8	3 745	34,3	9 938	41,0	16 162	56,6

mada — alluvial soil

Stężenie Concentration	*pH* 4,1		5,1		6,9		7,2		7,5		9,0	
	Ilość number	% per cent	Ilość number	% per cent	Ilość number	% per cent	Ilość number	% per cent	Ilość number	% per cent	Ilość number	% per cent
0	3 350	100	7 400	100	14 040	100	16 440	100	19 610	100	40 500	100
1050 γ	5 130	15,3	2 360	31,9	4 680	33,7	8 800	49,1	14 280	72,3	28 500	70,3

gleba torfowa — peat soil

Stężenie Concentration	*pH* 4,3		6,1		7,7		8,9	
	Ilość number	% per cent	Ilość number	% per cent	Ilość number	% per cent	Ilość number	% per cent
0	8 860	100	11 200	100	23 010	100	182 000	100
2000 γ	3 760	42,4	4 835	43,2	11 127	48,4	30 010	16,6

kach naturalnych tak wysokie stężenie streptomycyny w glebie jest najzupełniej nieprawdopodobne. Według danych z literatury najlepsze produkcyjne wyselekcjonowane szczepy promieniowców w czystej kulturze i w optymalnych warunkach osiągają wydajność do 2000 γ streptomycyny. Szczepy promieniowców świeżo wyizolowane z gleby wytwarzają natomiast do 30 γ na 1 ml podłoża (Waksman i Harris, 1949). Brak działania antybiotyku, stwierdzony w naszych doświadczeniach, nasuwa przypuszczenie, że antybiotyk ten ulega silnej inakty-

wacji w glebie. Na słuszność przypuszczenia, że jednym z czynników decydujących w tym przypadku może być zaadsorbowanie streptomycyny przez koloidy glebowe, wskazuje fakt wyraźnego zahamowania wzrostu drobnoustrojów w glebie leśnej, jako mało zasobnej w rozłożone związki organiczne, a tym samym posiadającej małą pojemność adsorpcyjną.

Tłumaczenie braku wpływu streptomycyny jedynie jej adsorpcją i inaktywacją w glebie może być tylko częściowo słuszne. Wpływ antybiotyku badano dopiero po 20-godzinnej inkubacji. Nie badano natomiast ewentualnych zmian w jakościowym składzie mikroflory oraz zmian ilości drobnoustrojów w okresie między wprowadzeniem antybiotyku do gleby a terminem pierwszej analizy (20 godzin). Nie wykluczone, że w ciągu tego czasu mogła wzrosnąć odporność drobnoustrojów pierwotnie wrażliwych na streptomycynę lub też, że mogła nastąpić selekcja mikroorganizmów naturalnie opornych. Pewne obserwacje pozwalają przypuszczać, że na pewne drobnoustroje glebowe streptomycyna może działać stymulująco. Wszystkie te zjawiska w efekcie mogą zrównoważyć spadek ilości mikroflory, wynikający z zahamowania rozwoju wrażliwych na streptomycynę drobnoustrojów. Wynika z powyższego, że jedynie ilościowa analiza mikroflory nie jest wystarczającą podstawą do sądzenia o braku działania antybiotyku w glebie. Powyższe zagadnienia, a w szczególności bliższa analiza zjawiska inaktywacji streptomycyny w glebie, wtórne powstawanie oporności drobnoustrojów glebowych na streptomycynę, jak również ewentualne zjawiska stymulacji są przedmiotem dalszych naszych badań.

Zjawisko znacznie silniejszego działania streptomycyny, stwierdzone przy obniżeniu odczynu gleby, można tłumaczyć między innymi, zmniejszeniem pojemności sorpcyjnej gleby na skutek koagulacji i wytrącania koloidów glebowych.

LITERATURA

Brian P. W., Wright J. M., Stubbs J. a. Wace A. M., 1951: Uptake of antibiotic metabolites of soil microorganisms by plants. *Nature.* **167**: 347.

Duda J., Giebel-Pędziwilk Z., Malińska E., 1957: Wstępne badania nad mikroflorą gleb łąkowych doliny Noteci. *Roczn. Nauk Roln.* F. **72**: 851.

Duda J., Kaszubiak H., 1957: Badania nad wpływem podłoża na aktywność antybiotyczną promieniowców glebowych. *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 253.

Gottlieb D., Siminoff P., 1952: The production and role of antibiotics in the soil. II. Chloromycetin. *Phytopatology*, **42**; 91.

Gottlieb D., Siminoff P., a. Martin M. M., 1952: The production and role of antibiotics in the soil. IV. Actidion and Clavacin. *Phytopathology*, **42**: 493.

Gregory K. F., Allen O. N., Riker A. J., Peterson W. H., 1951: Produc-

tion and stapility in soil of some antibiotics active against fungi. *Bact. Proc. Soc. Am. Bact.*: 18.

Hessayon D. G., 1951: Double action of trichothecin and its production in soil. *Nature.* **168**: 998.

Kuryłowicz W., Ślopek S., 1950: Streptomycyna. P. Z. W. L. Warszawa.

Kuryłowicz W., Woźnicka W., Borensztajn D., Niedźwiecka-Trzaskowska I., 1954: Badanie nad otrzymywaniem streptomycyny w skali laboratoryjnej. *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, **6**: 1.

Martin M., Gottlieb D., 1952: The production and role of antibiotics in the soil. III. Terramycin a. aureomycin. *Phytopathology.* **42**: 294.

Sandford G. B. and Broadfoot W. C., 1931: Studies of the soil inhibiting microorganisms on the virulence of *Ophiobolus graminis. Sacc. Sci. Agr.*, **11** : 512.

Siminoff P., Gottlieb D., 1951: The production and role of antibiotics in the soil I. The fate of streptomycin. *Phytopathology.* **41**: 420.

Voureka A., 1952: *J. gen. Microbiol.* **6** : 352 wg Kunickiego-Goldfingera: Zmienność u bakterii. *Acta Microbiol. Polon.*, 1954, **3**: 199.

Waksman S. A., Harris D. A., 1949: Streptomycin producing capacity of different strains of *Streptomyces griseus. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, **71**: 232.

Waksman S. A., Woodruf H. B., 1942: The occurence of bacteriostatic substances in the soil. *Soil Sci.*, **53**: 233.

J. Duda and *M. Kaszubiak*

STUDIES ON THE ACTIVITY OF STREPTOMYCIN IN SOIL

Summary

Streptomycin was added in different concentrations to various soils (forest soil, alluvial soil, peat soil) and effect of the antibiotic on soil microflora was examined. The antibacterial effect of streptomycin was more pronounced on mineral forest soil. In soils reach in organic matter decrease in viable count was observed only in very high concentration of antibiotic (1000 γ per 1 g).

Decrease in *pH* of soil caused some increase in streptomycin activity.

Factors affecting the influence of streptomycin in soil (adsorbtion, biological and chemical inactivation of the drug, selective and adaptive changes in microbe population) are discussed.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 355—365

J. Duda, E. Malińska i *Z. Pędziwilk*

ZALEŻNOŚĆ MIĘDZY ZAWARTOŚCIĄ WITAMINU B_{12} A ILOŚCIĄ MIKROFLORY W GLEBACH

Z Katedry Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu

Wpłynęło dnia 2 września 1957 r.

Obecnością enzymów i witaminów w glebie, traktowanych jako pewne wskaźniki biochemiczne, zajmowało się wielu badaczy. W badaniach tych starano się stwierdzić bądź tylko zawartość danej substancji, bądź też znaleźć odpowiednie korelacje między zawartością danej substancji a ilością mikroflory w glebie. Korelacja taka umożliwiałaby stosowanie metody biologicznej dla charakterystyki gleby poprzez oznaczenie wskaźników biochemicznych, z pominięciem żmudnych i nie zawsze możliwych badań mikrobiologicznych.

Badania nad aktywnością enzymatyczną gleby (Seegerer, 1953, Scheffer i Twachtmann, 1953, Balicka i Trzebiński, 1956) wykazały wprawdzie pewną korelację między zawartością poszczególnych enzymów a ilością i typem mikroflory gleby i innymi jej właściwościami; zależności te jednak były skomplikowane i nie pozwalały z wskaźników „siły enzymatycznej" wnioskować o aktywności mikrobiologicznej gleby czy o jej żyzności.

Również badania nad występowaniem w glebie różnych witaminów, głównie z grupy *B*, wykazały większą ich ilość w górnych, a więc w bogatszych w mikroflorę warstwach (Krasilnikow, 1954, Schmidt i Starkey, 1951). Występowanie witaminu B_{12} w glebie, jako produktu syntezy drobnoustrojów, stwierdziło kilku autorów (Robbins, Hervey i Stebbins, 1950, Burton i Lochhead, 1951, Lochhead i Burton, 1955, Krasilnikow, 1954, Duda, Pędziwilk i Zodrow, 1957). Na podstawie dotychczasowych badań

stwierdzono, że źródłem witaminu B_{12} w przyrodzie są jedynie drobnoustroje. Według Krasilnikowa 80-85% promieniowców glebowych posiada zdolność syntezy tego witaminu. Zdolność do wytwarzania tego czynnika jest również pospolita u bakterii, np. niektórych szczepów bakterii propionowych, licznych gatunków *Rhizobium* (Levin, Funk i Fendler, 1954, Kaszubiak, Malińska i Pędziwilk, 1957, Burton i Lochhead, 1952), azotobaktera (Duda — nie opublikowane), *Corynebacterium diphteriae* (Pawełkiewicz i Zodrow, 1956) i wielu innych. Większość bakterii glebowych jednak, jak wykazali Lochhead i Thexton (1951) oraz Lochhead i Burton (1955), wymaga witaminu B_{12} jako egzogennego czynnika wzrostowego. Według ostatnio cytowanej pracy Lochheada 80% badanych szczepów bakterii wymagających witaminu B_{12} należało do autochtonicznej mikroflory glebowej.

Z powyższego wynika, że warunkiem rozwoju pełnej mikrocenozy glebowej jest powszechne występowanie witaminu B_{12} w glebie, syntezowanego przez drobnoustroje auksoautotroficzne względem niego. Gromadzenie się w glebie witaminu B_{12} pochodzącego z resztek roślin jest mało prawdopodobne. Stwierdzono wprawdzie występowanie witaminu B_{12} w minimalnych ilościach u roślin zielonych, szczególnie w ich korzeniach (Robbins i inni, 1950), a w większych ilościach w bulwkach roślin motylkowych (Levin i inni, 1954, Duda i inni, 1957), witamin ten jednak najprawdopodobniej jest pobierany przez rośliny, prócz motylkowych, z gleby. Większa ilość witaminu B_{12} w bulwkach i ewentualnie w korzeniach roślin motylkowych może być syntezowana przez bakterie symbiotyczne, które w hodowlach laboratoryjnych wytwarzają liczne kobalaminy (Burton i inni, 1952, Kaszubiak i inni, 1957). W istocie zatem witamin B_{12} znajdujący się w roślinach nie stanowi istotnego źródła tego czynnika w glebie.

Wytwarzanie witaminu B_{12} przez liczne drobnoustroje glebowe oraz zapotrzebowanie na ten czynnik ze strony innych, pozwala przypuszczać, że zawartość jego może w znacznym stopniu korelować z ogólną ilością mikroflory gleby.

Wykrycie takiej korelacji było zadaniem niniejszej pracy. W tym celu przeprowadzono ilościowe analizy mikrobiologiczne profilów kilku gleb naturalnych oraz uprawnych, w latach 1956-1957, z równoczesnym oznaczeniem ilości witaminu B_{12}. Przeprowadzono też dodatkowo doświadczenie laboratoryjne, w którym próbki gleby intensywnie nawożono i w ustalonych terminach badano ilość drobnoustrojów i poziom witaminu B_{12}.

BADANIA WŁASNE

W roku 1956 przebadano 6 profilów glebowych, a w maju 1957 roku 5 dalszych. Bliższą charakterystykę laboratoryjną gleb podano w tabeli I.

Próby z poszczególnych poziomów pobierano przy pomocy jałowych metalowych pierścieni o objętości 100 cm^3. Analizy przeprowadzano w dniu pobrania prób. Ilość drobnoustrojów oznaczano metodą płytkową. Wyciągi glebowe do oznaczania witaminu B_{12} wykonano według metody podanej w pracy poprzedniej (Duda, Pędziwilk, Zodrow, 1957). Witamin B_{12} oznaczano przy użyciu testu *Euglena gracilis var. bacillaris* (Heinrich i Lahann, 1953).

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli II.

Wyniki powyższe wskazują na dość duże wahania zawartości witaminu B_{12} w zależności od głębokości badanej próbki w profilu oraz na duże różnice między poszczególnymi profilami. Szczególnie wysoki poziom witaminu B_{12} stwierdzono w glebie łąkowo-torfowej (Nr 1, 7 i 8). Wynika z tego, że o poziomie witaminu B_{12} decyduje nie tylko duża ilość drobnoustrojów, lecz również zawartość związków organicznych. Zaledwie śladowe ilości witaminu B_{12} znajdowano z reguły przy bardzo małej zawartości związków organicznych i małej ilości mikroflory (profil nr 11).

DOŚWIADCZENIA LABORATORYJNE NAD WPŁYWEM NAWOŻENIA ORGANICZNEGO NA ILOŚĆ WITAMINU B_{12} W GLEBIE

Celem dokładniejszego zbadania zależności między ilością drobnoustrojów a zawartością witaminu B_{12} w glebie przeprowadzono następujące doświadczenie:

Pobrano z pola uprawnego wierzchnią warstwę gleby (typ bielicowy) o 2,17% zawartości związków organicznych, o kwasowości wymiennej 7,65, kwasowości czynnej 7,71. Glebę przesiano przez sito o oczkach ⌀ 3,5 mm i rozważono po 1 kg do krystalizatorów. Wilgotność ustalono na 60% pełnej nasiąkliwości wodnej w stosunku do gleby powietrzno-suchej. Poszczególne kombinacje wzbogacono następującymi dawkami materiału organicznego:

a. próba kontrolna (bez nawożenia)
b. gleba wzbogacona 2 g mączki nasion soi
c. „ „ 10 g mączki nasion soi
d. „ „ 1 g peptonu i 2 g cukru (sacharozy)
e. „ „ 2 g mączki z lucerny (całe rośliny)
f. „ „ 10 g mączki z lucerny

Każdą kombinację wykonywano w trzech powtórzeniach. Krystalizatory przechowywano w termostacie w 28°, uzupełniając stale ubytek wody.

Aby zbadać zależność między ilością drobnoustrojów a ilością witaminu B_{12} wykonywano odpowiednie oznaczenia metodami podanymi wyżej. Analizy wykonano w 4 terminach: po 3, 6, 10 i 20 dniach hodowli. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli III.

Tabela I

Charakterystyka gleb — Characteristics of examined soils

Rok Year	Nr profilu Soil No	Poziom w cm Depth in cm	Sucha masa gleby w % Dry weight of soil in per cent	Związki organiczne w % Organic substances in per cent	Kwasowość czynna Acidity	Kwasowość wymienna Exchange acidity
1956	1 Gleba łąkowo-torfowa wytworzona z torfu niskiego trzcinowo-turzycowego	5—10	46,6	45,6	6,70	6,35
		25—30	40,1	27,6	6,70	6,40
	Meadow peaty soil	45—50	65,5	7,4	6,50	6,20
1956	2 Gleba typu bielicowego (las sosnowo-dębowy)	5—10	93,8	3,1	4,55	3,85
		10—15	93,9	1,7	4,70	4,20
	Podsol soil (forest)	30—35	93,1	2,3	4,80	4,70
		45—50	95,5	1,3	4,70	4,30
1956	3 Gleba typu bielicowego (las bukowy)	10—15	92,0	1,9	5,10	4,50
	Podsol soil (forest)	25—30	94,1	1,3	5,30	4,80
1956	4 Gleba typu bielicowego (las bukowy)	5—10	97,4	1,8	4,90	4,55
	Podsol soil (forest)	20—25	95,5	1,2	5,35	4,30
		38—42	97,8	0,9	5,55	5,45
1956	5 Gleba typu bielicowego (pobielicowa gleba uprawna) pole obsiane lucerną	10—15	89,2	2,2	7,18	6,80
	Podsol soil (alfalfa)	33—38	92,5	2,1	7,00	6,60
1956	6 Gleba typu bielicowego (pobielicowa gleba uprawna) pole obsiane owsem	10—15	90,8	2,1	6,60	6,35
	Podsol soil (oats)	34—37	95,6	1,6	6,25	5,75

1957	7	Gleba typu murszowego (mursz mocny) Muck	10—15 40—45	43,3 74,6	28,2 5,5	8,10 8,10	7,78 7,85
1957	8	Gleba typu murszowego (park klonowo-lipowy, bujne runo) Muck (garden)	10—15 40—45	85,7 81,0	3,7 4,5	7,98 8,20	7,40 7,95
1957	9	Gleba typu bielicowego (pobielicowa gleba uprawna) pole obsiane mieszanką owsa i jęczmienia Podsol soil (oats + barley)	10—15 43—47	95,5 94,1	2,7 0,5	5,93 7,10	5,60 5,98
1957	10	Gleba typu bielicowego (pobielicowa gleba uprawna) pole obsiane żytem Podsol soil (rye)	10—15 50—55	96,1 98,0	1,9 0,1	7,15 7,45	7,07 7,30
1957	11	Gleba typu bielicowego (bór świeży podmiejski bez podszycia) Podsol soil (forest)	5—10 30—35	98,4 97,1	1,0 1,1	5,50 4,91	4,48 4,79

Tabela II

Ilość drobnoustrojów i witaminu B_{12} w glebie

Number of microorganisms and content of vitamin B_{12} in soil

Rok Year No profilu	Opis profilu Soil	Poziom w cm Depth in cm	Ilość drobnoustrojów w tysiącach w 1 g suchej masy gleby Number of microorganisms per 1 g of dry mass of soil, in thousands				Ilość witaminu B_{12} w 1 g suchej masy gleby w mμg B_{12} in mμg per 1 g of dry mass of soil
			bakterie bacteria	w tym: among bacteria: promieniowce Actinomycetes	w tym: among bacteria: formy przetrwalne spores	grzyby fungi	
1956 1	Gleba łąkowo-torfowa wytworzona z torfu niskiego trzcinowo-turzycowego Meadow peaty soil	5—10	23200	22,6	1,2	3	53,61
		25—30	14900	1,8	0,8	2	11,85
		45—10	3200	1,4	1,0	1	5,35
1956 2	Gleba typu bielicowego (las sosnowo-dębowy) Podsol soil (forest)	5—10	1600	17,6	2,7	49	1,65
		10—15	2300	34,0	1,1	17	0,75
		30—35	1200	2,5	1,8	22	0,64
		45—50	2200	42,2	0,04	5	0,68
1956 3	Gleba typu bielicowego (las bukowy) Podsol soil (forest)	10—15	3600	2,4	0,6	51	0,73
		25—30	500	37,0	3,2	14	0,41
1956 4	Gleba typu bielicowego (las bukowy) Podsol soil (forest)	5—10	2700	6,4	1,3	80	0,85
		20—25	1000	20,4	2,7	18	0,51
		38—42	6100	2,7	0,2	6	0,44
1956 5	Gleba typu bielicowego (pobielicowa gleba uprawna) pole obsiane lucerną Podsol soil (alfalfa)	10—15	8700	50,3	4,5	9	8,69
		34—37	7900	18,9	0,8	0	0,54
1956 6	Gleba typu bielicowego (pobielicowa gleba uprawna) pole obsiane owsem Podsol soil (oats)	10 15	7400	50,0	14,8	32	3,58
		34—37	4100	24,4	5,5	8	0,86
1957 7	Gleba typu murszowego (mursz mocny) Muck	10 - 15	10200	12,2	16,8	0,7	53,18
		40—45	900	28,2	26,7	0,—	3,69
1957 8	Gleba typu murszowego (park klonowo-lipowy, bujne runo) Muck (garden)	10—15	5600	17,0	22,6	3	23,33
		40—45	5100	18,8	32,0	7	6,18
1957 9	Gleba typu bielicowego (pobielicowa gleba uprawna) pole obsiane mieszanką owsa i jęczmienia Podsol soil (oats + barley)	10—15	12600	31,5	18,0	53	3,01
		43—47	2400	12,6	7,1	2	0,05
1957 10	Gleba typu bielicowego (pobielicowa gleba uprawna) pole obsiane żytem Podsol soil (rye)	10—15	16500	31,0	9,9	22,0	4,81
		50—55	1900	28,0	16,5	1	0,08
1957 11	Gleba typu bielicowego (bór świeży podmiejski bez podszycia) Podsol soil (forest)	5—10	700	51,9	7,9	203	0,05
		30—35	100	11,6	18,1	24	0,03

Tabela III

Wpływ nawożenia organicznego na ilość drobnoustrojów i zawartość witaminu B_{12} w glebie

Influence of organic fertilizers on the number of microorganisms and content of vitamin B_{12}

Rodzaj nawożenia (na 1 kg gleby) Fertilizers (per 1 kg of soil)	Czas inkubacji, dni Incubation period, days	Ilość drobnoustrojów w tysiącach w 1 g suchej masy gleby Number of microorganisms per 1 g of dry mass of soil, in thousands		Ilość witaminu B_{12} w 1 g suchej masy gleby w mμg Vitamin B_{12} in mμg per 1 g of dry mass of soil
		bakterie bacteria	w tym % promieniowców actinomycetes p. c. of total bacterial count	
próba kontrolna	3	7500	30,0	1,07
control	6	15400	34,6	1,19
	10	17400	39,6	1,28
	20	14000	41,0	0,62
2 g mączki nasion soi	3	—	—	3,47
2 g of soybean	6	113400	3,3	2,14
	10	78400	6,8	1,58
	20	61200	15,7	0,73
10 g mączki nasion soi	3	630900	2,2	6,14
10 g of soybean	6	315200	4,4	4,81
	10	239700	9,0	5,61
	20	130600	12,0	6,20
1 g peptonu i 2 g cukru	3	85800	8,1	1,26
1 g of peptone 2 g of saccharose	6	109000	5,1	4,54
	10	74600	5,1	4,27
	20	68800	7,8	0,59
2 g mączki z lucerny	3	188400	2,4	5,21
2 g of alfalfa	6	90400	5,9	3,54
	10	84800	6,5	1,27
	20	66200	8 4	0,68
10 g mączki z lucerny	3	528500	2,3	6,18
10 g of alfalfa	6	334400	6,5	7,25
	10	370500	7,3	5,91
	20	211500	8,1	0,98

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Badania nasze wykazały obecność witaminu B_{12} we wszystkich badanych typach gleb. Stwierdzono jednak znaczne różnice między poszczególnymi glebami. Szczególnie dużą ilość witaminu B_{12} znaleziono w wierzchnich warstwach organicznej gleby torfowo-łąkowej oraz gleb murszowych (ponad 50 mμg na 1 g gleby). Są to ilości znacznie większe od obserwowanych przez Robbinsa i innych (1951), sięgających tylko 15 mμg. Ilość witaminu B_{12} w innych badanych glebach (bielicowe gleby uprawne i leśne) mieszczą się w granicach przytaczanych przez powyższych autorów.

W związku ze stwierdzoną wysoką zawartością witaminu B_{12} w glebach organicznych nasuwa się przypuszczenie, że witamin B_{12} może być raczej wskaźnikiem zawartości masy organicznej w glebie aniżeli wskaźnikiem ilości drobnoustrojów. Celem zbadania zależności między zawartością witaminu B_{12} i ilością mikroflory oraz masą organiczną gleby obliczono, opierając się na tabeli II, ilości witaminu B_{12} przypadające na 1 milion bakterii i 1 g suchej masy organicznej. Dane te dla górnych poziomów badanych gleb, jako najbardziej charakterystyczne, zestawiono w tabeli IV.

Tabela IV

Ilość witaminu B_{12} przypadającego na jednostkę drobnoustrojów i masy organicznej gleby

Amount of vitamin B_{12} in relation to number of bacteria and content of organic matter in soil

Profil gleby Soil	Poziom w cm Depth in cm	Ilość witaminu B_{12} w mμg na: Vitamin B_{12} per	
		10^6 bakterii 10^6 of bacteria	1 g masy organicznej 1 g of organic substances
1	5—10	2,31	117,5
2	5—10	1,00	52,9
3	10—15	0,21	38,8
4	10—15	0,32	47,1
5	10—15	1,00	396,9
6	10—15	0,46	165,7
7	10—15	5,20	188,7
8	10—15	4,20	622,9
9	10—15	0,24	112,2
10	10—15	0,29	258,8
11	5—10	0,08	5,0

Z przytoczonych przeliczeń wynika, że wahania w zawartości witaminu B_{12} przypadającej na jednostkę bakterii (10^6) i jednostkę masy

organicznej gleby są znaczne: w pierwszym przypadku sięgają 7000% (profil 7 i 11), a w drugim aż 12 000% (profil 8 i 11). Powyższe dane wskazują na brak korelacji między zawartością witaminu B_{12} a ilością drobnoustrojów bądź zawartością masy organicznej w glebie, aczkolwiek między tymi trzema czynnikami zachodzą wyraźne powiązania.

Znacznie wyraźniejszą korelację między powyższymi trzema czynnikami znaleziono w doświadczeniu laboratoryjnym nad wpływem nawożenia organicznego na wzrost ilości mikroflory i stężenia witaminu B_{12}. Zależność między wzrostem ilości drobnoustrojów i zawartości witaminu B_{12} przedstawiają obliczone wskaźniki zwielokrotnienia ogólnej ilości drobnoustrojów (średnie wartości z czterech oznaczeń), oraz takie same wskaźniki dla witaminu B_{12}.

Tabela V

Wskaźniki zwielokrotnienia ilości mikroflory i witaminu B_{12} pod wpływem nawożenia

The increase in number of microorganisms and vitamin B_{12} content, due to fertilizers

Kombinacja nawożenia Fertilizers (See table IV)	Wskaźniki zwielokrotnienia — Increase	
	ilości bakterii number of bacteria	ilość witaminu B_{12} vitamin B_{12} content
I	1,0	1,0
II	6,1	1,5
III	32,0	5,6
IV	6,1	2,6
V	7,7	2,6
VI	25,0	5,0

Nawożenie organiczne wywołało, jak widzimy z tabeli III, przede wszystkim gwałtowny wzrost ilości bakterii, ilość promieniowców natomiast nieznacznie wzrosła, albo w ogóle nie zmieniła się. Procentowo przeto ilość promieniowców przy nawożeniu gwałtownie się obniżyła. Znaczny wzrost ilości witaminu B_{12} w tych kombinacjach dowodzi, że przy jego syntezie w glebie bakterie czynne są przynajmniej w tym samym stopniu co i promieniowce.

Z przedstawionych badań można wysunąć następujące wnioski:

1. Witamin B_{12} występuje we wszystkich glebach. Wahania w jego zawartości związane są z ilością mikroflory i zasobnością gleb w substancje organiczne.

2. Wysoki wskaźnik witaminu B_{12} w przeliczeniu na jednostkę mikroflory wykazują gleby organiczne, znacznie niższy — gleby mineralne.

3. Pewien stopień zależności między ogólną ilością mikroflory a poziomem witaminu B_{12} wskazuje na powiązanie obu czynników.

4. Oznaczenie ilościowego wskaźnika witaminu B_{12} nie daje wystarczającej przesłanki do wnioskowania o ilości i aktywności drobnoustrojów w glebie oraz o jej żyzności.

LITERATURA

Balicka N. i Trzebiński M., 1956: Aktywność enzymatyczna i obecność witaminy B_2 w glebie. *Acta Microbiol. Polon.*, **5**: 377.

Burton M. i Lochhead G., 1951: Studies on the production of vitamin B_{12} -active substances by microorganisms. *Canad. J. Botan.* **29**: 352.

Burton M. i Lochhead G., 1952: Production of vitamin B_{12} by *Rhizobium species. Canad. J. Botan.* **30**: 521.

Duda J., Giebel-Pędziwilk Z., Malińska E., 1957: Wstępne badania nad mikroflorą gleb łąkowych doliny Noteci. *Roczn. Nauk Roln.* **72**: 851.

Duda J., Pędziwilk Z., Zodrow K., 1957: Badania nad wytwarzaniem witaminu B_{12} u roślin motylkowych. *Acta Microbiol. Polon.* **6**: 233.

Heinrich H. C., Lahann H., 1953: Die mikrobiologische Bestimmung der B_{12}-Vitamine mit der Grünalge *Euglena gracilis var bacillaris. Z. Naturforschung* **8b**: 549.

Kaszubiak H., Malińska E., Pędziwilk Z., 1957: Badania nad wytwarzaniem i składem kobalamin u *Rhizobium meliloti. Acta Microbiol. Polon.* 6: 239.

Krasilnikow H. A., 1954: Mikroorganizmy i płodorodije poczw. *Izwiestija AN SSRR*, Seria bioł., 2: 14.

Levin A. P., Funk A. B., Tendler M. D., 1954: Vitamin B_{12}, *Rhizobia* and leguminous plant. *Science.* **120**: 784.

Lochhead A. G. i Burton M., 1955: Qualitative studies of soil microorganisms. XII Characteristics of vitamin B_{12} — requiring bacteria. *Canad. J. Microbiol.*, **1**: 319.

Lochhead A. G. i Thexton R. H., 1951: Vitamin B_{12} a growth factor for soil bacteria. *Nature* **167**: 1034.

Pawełkiewicz J., Zodrow K., 1956: The synthesis of cobalamins by *Corynebacterium diphteriae. Acta Microbiol. Polon.*, **5**: 319.

Robbins W. J., Hervey A. i Stebbins M. E., 1950: Studies on *Euglena* and vitamin B_{12}. *Bull. Torrey Botan. Club.* **77**: 423.

Scheffer F. i Twachtmann R., 1953: Erfahrungen mit der Ensymmethode nach Hoffmann. *Zeitschr. Pflanz Dung. Bodenk.*, **62**: 158.

Schmidt E. L. i Starkey R. L., 1951: Soil microorganism: II. Transformations of certain *B*-vitamins in soil. *Soil Sci.*, **71**: 221.

Seegerer A., 1953: Der Sacharasegehalt des Bodens als Massstab seiner biologischen Activität. *Zeitschr. Pflanz. Dung. Bodenk.*, **61**: 251.

J. Duda, E. Malińska and *Z. Pędziwilk*

RELATIONSHIP BETWEEN THE CONTENT OF VITAMIN B_{12} AND THE NUMBER OF MICROORGANISMS IN SOIL

Summary

Concentration of vitamin B_{12} and viable count of microorganisms were examined in 11 different soils (podsol soil, peaty soil, muck, table I).

Results are given in Table II. It was established that concentration of vitamin B_{12} is higher in soil reach in organic matter. In peaty soil (meadow) and in muck the concentration reached 50 mμg per 1 g.

The effect of organic fertilizers on vitamin B_{12}-content and microbes number was examined in laboratory experiments (table III). The increase in both indices was observed, but correlation between them was low.

Table IV gives vitamin B_{12} content calculated per 1 g of organic matter and per 10^6 bacterial cells. The fluctuations are very distinct.

The results of authors' experiments lead to conclusion that vitamin B_{12} concentration could not be used as an index of fertility or soil biological activity.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 367—376

I. Januszewicz

ZMIANY WŁASNOŚCI BIOCHEMICZNYCH SZCZEPU *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* W ZALEŻNOŚCI OD WARUNKÓW PRZECHOWYWANIA

Z Zakładu Technologii Fermentacji Przemysłowych
Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego
w Warszawie.

Wpłynęło dnia 29 czerwca 1957 r.

Na podstawie doświadczeń przeprowadzonych w okresie od marca 1952 r. do lutego 1955 r. (Januszewicz, 1955) zostało stwierdzone, że *Leuconostoc mesenteroides* (szczep *L*) hodowany na podłożach sztucznych zatraca zdolność do intensywnego tworzenia dekstranu. Degeneracja następuje przeważnie nagle i nie da się z góry przewidzieć. Liofilizacja zabezpiecza tylko częściowo stałość cech biochemicznych *L. mesenteroides*, bowiem kultury ożywione, po pewnym okresie przechowywania w stanie zliofilizowanym, wymagały dokonania pewnych niewielkich zmian w składzie podłoża, w celu osiągnięcia maksymalnych wydajności dekstranu.

Doniesienie obecne obejmują dalsze obserwacje nad zmianami właściwości biochemicznych szczepu *L. mesenteroides L.* zachodzącymi prawdopodobnie pod wpływem przechowywania kultur w stanie zliofilizowanym.

Kultura ożywiona po liofilizacji posiada następujące znakowanie: literę alfabetu oznaczającą szczep, datę liofilizacji i datę ożywienia.

METODYKA BADAŃ

1. Liofilizacja mikroorganizmów i ich ożywienie.

Do liofilizacji i ożywienia bakterii stosowano technikę opisaną w pierwszym doniesieniu na temat wpływu przechowywania *L. mesenteroides* na jego cechy biochemiczne (Januszewicz, 1953), z tą tylko różnicą, że od 1956 roku zawiesinę bakterii do liofilizacji sporządzono z 2-dniowej kultury agarowej.

2. Biosynteza dekstranu.

Biosyntezę dekstranu prowadzono na podłożu płynnym, rozlanym po 200 ml do kolb półlitrowych i jałowionym przez 20 minut w 112°. Szczep hodowano przez dwie doby na agarze skośnym, po czym przenoszono jedno uszko ezy (o średnicy 0,5 cm) do 40 ml płynnej pożywki, zawierającej autolizat drożdżowy w ilości dwa razy większej niż w podłożu używanym do biosyntezy. Osiemnastogodzinną hodowlą płynną na takim podłozu szczepiono podłoża do biosyntezy. W październiku 1954 r. ustalono następujący skład podłoża do biosyntezy dekstranu:

sacharoza	—	100 g
$Na(NH_4)HPO_4$	—	3 g
KH_2PO_4	—	1 g
$MgSO_4$	—	0,1 g
KCl	—	0,1 g
$MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$	—	0,01 g
woda wodociągowa do		1000 ml

0,5 ml autolizatu drożdżowego (jałowionego przez sączenie) dodawano po sterylizacji podłoża.

pH podłoża 6,5 — 6,6

Do hodowli szczepu stosowano podłoże agarowe o takim samym składzie, ale z dziesięciokrotnie większą zawartością autolizatu.

3. Oznaczenie wydajności dekstranu.

Dekstran w podłożu fermentującym oznaczano metodą wagową, względnie metodą pośrednią, oznaczając ilości uwolnionej fruktozy metodą Luffa-Schoorla (teoretycznie ze 100 g sacharozy powstaje 47,36 g dekstranu i 54,64 g fruktozy).

Metoda wagowa jest metodą bardzo pracochłonną i długotrwałą i z tych względów nie nadaje się do masowych, szybkich oznaczeń.

Oznaczenie fruktozy metodą Luffa-Schoorla zastosowano ze względu na to, że stwierdzono występowanie glikozy w roztworze fermentującym jedynie w ilościach śladowych, (w podłożu do biosyntezy przed posiewem bakterii nie stwierdzono obecności substancji redukujących). Na podstawie licznych prób wykazano, że ilość fruktozy uwolnionej w czasie biosyntezy dekstranu jest proporcjonalna do ilości powstającego dekstranu. Mnożąc ilość fruktozy przez 0.9 otrzymujemy ilość powstałego dekstranu. Oceny tej metody dokonano przez porównanie jej wyników z oznaczeniami dekstranu metodą wagową z uwzględnieniem ilości zaobserwowanych cukrów i wody.

Metoda pośrednia oznaczania wydajności dekstranu, z uwagi na szybkość wykonania, pozwala na kontrolę przebiegu fermentacji. Od 1956 r. oznaczano w brzeczce fermentującej, co 24 godziny, ilość uwalnianej fruktozy, z której obliczono ilość powstającego dekstranu.

Opracowanie i analiza powyższych metod omówione są w pracy mgra Kaniugi (K a n i u g a, 1956).

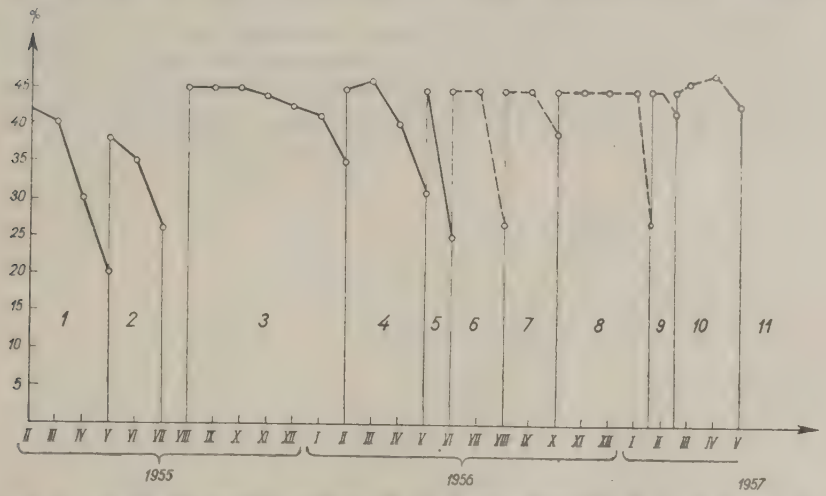
WYNIKI

Zależność wydajności dekstranu od rodzaju użytej kultury i podłoża w okresie od lutego 1955 r. do czerwca 1957 r. przedstawia rysunek 1.

Na wykresie podano średnie dane z każdego miesiąca, uzyskane z kolb kontrolnych, nastawianych równolegle do fermentacji, prowa-

dzonych w skali półtechnicznej w 500 litrowych fermentorach ze stali nierdzewnej. Należy zaznaczyć, że wydajność dekstranu w fermentacji w skali półtechnicznej była podobna (z nielicznymi tylko wyjątkami) do wydajności uzyskanych w kolbach kontrolnych.

Jak wynika z wykresu kultura *L — 29. VII. 53. — X. 54* zaczęła zatracać zdolność do intensywnego tworzenia dekstranu już w marcu.

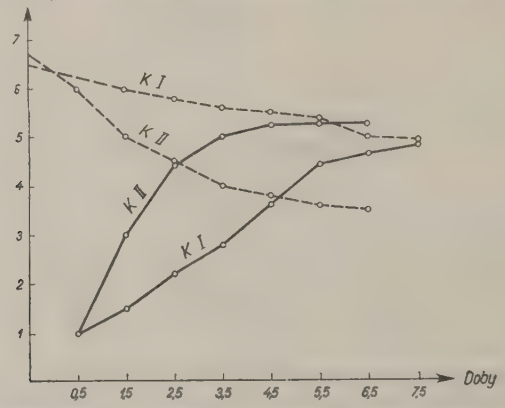


Rys. 1. Zmiany wydajności dekstranu w % zużytej sacharozy, w zależności od rodzaju użytej kultury i podłoża. 1 — *L-29. VII. 53-X. 54*, autolizat 0,03%, *pH* 6,5-6,6, 2 — *L-17. IX. 53-18. X. 54*, autolizat 0,03%, *pH* 6,7, 3 — *L-9. XII. 54-6. VIII. 55*, autolizat 0,22%, *pH* 6,7, 4 — *L-21. IV. 55-21. I. 56*, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ — 0,0005%, autolizat 0,15%, *pH* 6,7, 5 — *L-2. III. 56-13. IV. 56*, autolizat 0,15%, *pH* 6,7, 6 — *L-2. III. 56-28. V. 56*, autolizat 0,5% *pH* 6,5 7 — *L-18. VI. 56-14. VIII. 56*, autolizat 0,15%, *pH* 6,7, 8 — *L-30. I. 53 — 25. VIII. 56*, autolizat 0,15%, *pH* 6,7, 9 — *L-30. I. 53-25. VIII. 56*, autolizat 0,15%, *pH* 6,7, 10 — *L-1. III. 57* bezpośrednio po liofilizacji (after liofilisation), autolizat 0,2%, *pH* 6,7, 11 — *L-1. III. 57-23. V. 57*, autolizat 0,175%, *pH* 6,7

Fig. 1. Yield of dextran (per cent of saccharose used) in relation to strain and media used in production

Kolejna hodowla *L — 17. IX. 53 — 18 X. 54* w bardzo krótkim czasie zdegenerowała. W lipcu doświadczeń nie prowadzono. W sierpniu ożywiono kilka kultur zliofilizowanych w celu wytypowania najlepszej do produkcji dekstranu w skali półtechnicznej. Bardzo dobre rezultaty uzyskano z kulturą *L — 9. XII. 54 — 6. VIII. 55*, jednak przy zwiększonej ilości autolizatu w podłożu (do 0,22% objętości, czyli siedmiokrotnie więcej). W pierwszych miesiącach 1956 r. zaznaczył się wyraźny spadek

wydajności tej kultury. Wobec tego, jak zwykle, ożywiono kilka zliofilizowanych kultur i na podstawie prób laboratoryjnych wytypowano do produkcji kulturę *21. IV. 55 — 21. I. 56*. Przy zastosowaniu tej kultury, w celu optymalnej wydajności dekstranu należało dodatkowo wprowadzić do zasadniczego podłoża 0,0005% $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ oraz zmniejszyć ilość autolizatu do 0,15% objętościowych. Kultura ta dawała bardzo wysoką wydajność, dochodzącą prawie do maksimum teoretycznego, w ciągu 2 miesięcy. Następnie jednak wydajność zaczęła stopniowo spadać, dochodząc w maju do około 20%. Następna kultura *L — 2. III. 56. — 13. IV. 56* była aktywna jedynie przez bardzo krótki okres czasu (około 2 tygodni), a następnie gwałtownie zaczęła degenerować.



Rys. 2. Zmiany zawartości fruktozy i *pH* w czasie syntezy dekstranu (2 różne kultury). K I — kultura Nr *L-21. IV. 55-21. I. 56*, K II — kultura Nr *L-3. III. 56-28. V. 56* ———— *pH* ———— g fruktozy w 100 ml podłoża

Fig. 2. Changes in fructose concentration and in *pH* during dextran synthesis. K I — culture No *L-21. IV. 55 — 21. I. 56*. K II — culture No *L-3. III. 56 — 28. V. 56*. ———— *pH* ———— fructose in g per 100 ml of medium

W czerwcu, przy zastosowaniu kultury *L — 2. III. 56. — 28. V. 56* stwierdzono, na podstawie kontroli przebiegu fermentacji w skali laboratoryjnej i półtechnicznej, że fermentacja praktycznie kończy się po 3,0-3,5 dobach, a przyrosty ilości dekstranu w późniejszym okresie są niewielkie. Dotychczas dobrą wydajność uzyskiwano dopiero po 6,0-6,5 dniach. Skład podłoża (ilość autolizatu, *pH*, ilość i jakość mikroelementów) oraz sposób prowadzenia fermentacji nie uległy zmianie.

Na wykresie drugim (rys. 2) przedstawiono szybkość uwalniania fruktozy oznaczanej co 24 godziny oraz wahania *pH* w kulturach *L—21.IV.55 — 21.I.56* i *L—2.III.56 — 28.V.56*. (do doświadczenia wzięto kultury w okresie ich największej aktywności).

Kultury te, jak widać, różnią się bardzo między sobą pod względem szybkości fermentacji i obniżania *pH*. Przypuszczaliśmy zatem, że otrzymaliśmy nowy wariant wyselekcjonowany przy pomocy liofilizacji. Należało przeto sprawdzić przebieg fermentacji kultur macierzystych, od których pochodzi kultura *3.III.56 — 28.V.56*. W tym celu ożywiono je tego samego dnia.

W tabeli I zebrano dane obrazujące wydajność produkcji dekstranu szeregu kultur przed liofilizacją, bezpośrednio po liofilizacji, po pewnym okresie przechowywania w stanie zliofilizowanym oraz po dwumiesięcznych przesiewach na podłożu agarowym. Wydajności podane w tabeli są średnimi z 2 lub 3 równoległych powtórzeń (z każdej kolby wykonywano 2 oznaczenia). W rubryce pierwszej podano pochodzenie kultury zgodnie z przyjętym znakowaniem (patrz str. 367).

Zdolność do produkcji dekstranu oznaczono na podłożu do biosyntezy dekstranu z dodatkiem manganu i molibdenu oraz 0,15% objętościowych autolizatu.

Pięć pierwszych kultur w tabeli I są to kultury macierzyste, z których wywodzi się kultura *2.III.56 — 28.V.56*. Ta ostatnia odznacza się skróconym okresem fermentacji.

Wielokrotne eksperymenty w skali laboratoryjnej i półtechnicznej wykazały, że fermentacja pięciu pierwszych kultur kończyła się dopiero po 6,0-6,5 dniach. Dlatego też wydajność dekstranu kultur pochodnych, przed i bezpośrednio po liofilizacji, oznaczono jedynie po 6 dniach fermentacji. Po ożywieniu tych kultur w sierpniu 1956 r. okazało się jednak, że odznaczają się one wszystkie krótkim okresem fermentacji (3 doby).

Pięć następnych kultur w tabeli I pochodzi od jednej kultury *L—21.IV. 55 — 21.I.56*, liofilizowanej w odstępach kilkudniowych. Osiem dalszych pochodzi od kultury *L—2.III.56 — 28.V.56*. Jak widać wszystkie te kultury przed liofilizacją, bezpośrednio po liofilizacji oraz po 2-miesięcznym przechowywaniu charakteryzowały się krótkim okresem fermentacji.

Liczby przytoczone w tabeli pozwalają przypuszczać, że w czasie liofilizacji i przechowywania bakterii zliofilizowanych obumierają osobniki wytwarzające mało dekstranu. Osobniki takie można by traktować jako gorzej przystosowane do niesprzyjających warunków życiowych, jeśli wytwarzanie śluzu uznano by za objaw morfologicznego zaadaptowania się bakterii do takich warunków. Za tym punktem widzenia przemawiają następujące fakty: a) intensywne tworzenie się dekstranu przy odpowiednio dobranych warunkach hodowli, ograniczających rozmnażanie bakterii, b) utrata oporności na wysoką temperaturę (80° przez 5 minut, łatwo znoszoną przez komórki otoczone dekstranem) po zniszczeniu śluzu przez hydrolizę dekstranu lub przy hodowli bakterii na podłożu uniemożliwiającym powstawanie dekstranu.

Tabela I

Wpływ liofilizacji i okresu przechowywania kultur zliofilizowanych na produkcję dekstranu

Effect of lyofilisation and period of storage on the dextran-productivity of *L. mesenteroides* culture

Kultura macierzysta Mother culture	Symbol kultury Culture designation	Wydajność dekstranu w stosunku do zużytej sacharozy w % Yield of dextran — per cent saccharose used				Okres przechowywania (w miesiącach) Period of storage (months)	Wydajność dekstranu w stosunku do zużytej sacharozy w % po przechowywaniu Yield of dextran (per cent saccharose used of stored strains			
		przed liofilizacją before lyofilisation		bezpośrednio po liofilizacji after lyofilisation			po 2 przesiewach na podłoże agarowe after 2 passages on an agar medium		po 10 przesiewach na podłoże agarowe after 10 passages on an agar medium	
		okres fermentacji — dni, fermentation period — days					okres fermentacji — dni, fermentation period — days			
		3	6	3	6		3	6	3	6
Z kultury wyosobnionej z lemoniady w 1951 r. Culture isolated from limone-juice in 1951	*31. V. 52 — 25. VIII. 56*	—	35,6	—	36,0	51	41,2	44,6	17,0	36,3
31. V. 52 — XII. 52	*30. I. 53 — 25. VIII. 56*	—	38,0	—	42,4	43	44,6	43,8	40,9	44,2
30. I. 53 V. 53	*29. VII. 53 — 25. VIII. 56*	—	36,0		—	37	44,1	43,8	34,6	43,5
29. VII. 53 — X. 54	*29. XI. 54 — 25. VIII. 56*	—	40,0	—	40,0	21	42,0	43,8	31,3	44,2

29. XI. 54 — 9. IV. 55	*21. IV. 55 — 25. VIII. 56*	—	38,0	—	40,0	16	42,6	43,4	21,3	39,2
21. IV. 55 — 21. I. 56	*2. III. 56 — 25. VIII. 56*	—	40,0	—	41,0	6	42,7	43,3	18,0	33,3
	3. III. 56 — 25. VIII. 56	—	42,0	—	42,5	6	42,3	42,9	17,0	24,0
	6. III. 56 — 25. VIII. 56	—	42,0	—	43,0	6	40,6	42,9	17,8	35,3
	7. III. 56 — 25. VIII. 56	—	42,0	—	42,9	6	30,5	42,5	10,8	21,8
	5. IV. 56 — 25. VIII. 56	—	39,1	—	41,7	5	28,7	40,7	11,9	25,8
2. III. 56 — 28. V. 56	*18. VI. 56 — 25, VIII. 56*	37,2	43,2	37,8	42,4	2	41,5	44,6	10,7	25,4
	20. VI. 56 — 25. VIII. 56	38,7	39,6	37,8	41,4	2	33,1	45,1	18,0	38,7
	22. VI. 56 — 25. VIII. 56	40,1	42,3	38,0	43,2	2	40,7	43,4	10,4	25,2
	29. VI. 56 — 25. VIII. 56	42,8	45,0	44,9	44,9	2	43,8	43,2	28,1	45,3
	30. VI. 56 — 25. VIII. 56	42,3	45,5	42,2	45,5	2	41,5	43,4	33,8	45.3
	3. VII. 56 — 25. VIII, 56	42,3	45,5	42,2	45,5	2	43,6	42,8	16,1	33,7
	4. VII. 56 — 25. VIII. 56	40,3	45,4	40,9	45,5	2	32,6	43,4	6,8	18,0
	13. VII. 56 — 25. VIII. 56	34,5	35,9	37,0	38,6	1,5	36,4	44,1	16,3	34,3

W celu potwierdzenia selekcyjnego działania liofilizacji poddano liofilizacji 4 kultury zdegenerowane w czasie hodowli laboratoryjnej, które na płynnym podłożu z sacharozą wytwarzały bardzo małe ilości dekstranu. Zawiesinę bakterii do liofilizacji sporządzano w jałowej wodzie wodociągowej z dwudniowej hodowli na normalnym podłożu agarowym. Ponadto hodowano bakterie na podłożu z dużą dawką autolizatu (0,6 ml autolizatu na 10 ml) przygotowując zawiesinę do liofilizacji w jałowym mleku odtłuszczonym. Uzyskane wyniki podano w tabeli II.

Tabela II

Wpływ liofilizacji na wytwarzanie dekstranu przez kultury zdegenerowane
Effect of lyofilisation on dextran productivity of degenerated cultures

Symbole kultur Culture designations	Liofilizowane w wodzie *(W)* w mleku *(M)* Lyofilised in water *(W)* milk *(M)*	Wydajność dekstranu w stosunku do zużytej sacharozy % Yield of dextran (per cent of saccharose used)			
		przed liofilizacją before lyofilisation		po liofilizacji after lyofilisation	
		fermentacja fermentation	dni days	fermentacja fermentation	dni days
		3	6	3	6
21. IV. 55 — 21. I. 56	*W*	ślady traces	10,6	5,6	12,8
	M	ślady traces	10,6	6,4	12,0
9. XII. 54 — 6. VIII. 55	*W*	6,8	19,4	7,2	21,3
	M	7,2	16,4	7,2	19,4
2. III. 56 — 23. VIII. 56	*W*	8,5	21,7	9,1	25,3
	M	9,3	15,5	13,7	30,1
5. IV. 56 — 23. VIII. 56	*W*	8,5	18,0	9,1	18,6
	M	8,1	16,3	8,6	18,6

Widoczne jest, że wydajność dekstranu wszystkich czterech kultur ożywionych bezpośrednio po liofilizacji była wyraźnie wyższa, a w jednym przypadku wzrosła prawie o 100%.

Dla zilustrowania wpływu liofilizacji na zachowanie zdolności dekstranotwórczej można przytoczyć następujące dane: w latach 1953-1957 44 razy liofilizowano szczep produkcyjny w okresie jego największej aktywności. W 70% przypadków wydajność po liofilizacji zwiększyła się o kilka procent, w 14% nie uległa zmianie i w 15% spadła o kilka procent.

Wszystko to wydaje się wskazywać, że liofilizacja jest do pewnego stopnia naturalnym czynnikiem selekcjonującym bardziej aktywne osob-

niki. Każda bowiem czysta kultura po kilku przeszczepieniach staje się populacją bakterii o różnych własnościach biochemicznych. Prawdopodobnie zamrażanie i suszenie zabija osobniki o małej aktywności dekstranotwórczej.

W celu zobrazowania różnej szybkości procesu degeneracji poszczególnych kultur w hodowli laboratoryjnej podano w tabeli I wydajności dekstranu po 10 przesiewach na podłożu agarowym (około dwumiesięczna hodowla laboratoryjna). Jak widać, tylko bardzo nieliczne kultury zachowały swoją pierwotną aktywność. Dotyczy do zwłaszcza kultury *30.I.53 — 3.V.53*, która jeszcze po trzech miesiącach wytwarzała duże ilości dekstranu.

Nie stwierdzono aby kultury dłużej przechowywane po zliofilizowaniu odznaczały się dłuższym okresem aktywności przy hodowli na agarze. Wprawdzie pozornie mogłoby się tak zdawać na podstawie danych tabeli I, jednak przeczą temu wyraźnie dane w tabeli III.

Tabela III

Okres aktywności kultur w czasie hodowli laboratoryjnej w zależności od okresu ich przechowywania w stanie zliofilizowanym

Effect of period of storage on the stability of dextran producing power of *L. mesenteroides*

Symbol kultury Culture	Okres przechowywania w miesiącach Storage - months	Okres aktywności szczepu w hodowli laboratoryjnej w mies. Period of high activity - months
30.I.53 - 25.VIII.56	43	4
29.VII.53 - 18.X.54	14	3,5
17.IX.53 - 18.X.54	13	1,5
21.IV.55 - 21.I. 56	9	3,5
9.XII.54 - 6.VIII.55	8	5,5
29.VI.56 - 24.I.57	7	3,0
29.XI.54 - 9.IV.55	4	2
8.I.55 - 3.V.55	4	0,5
2.III.56 - 28.V.56	3	2,5
18.VI.55 - 14.VIII.56	2	1
21.IV.55 - 8.VI.55	1,5	0,5
2.III.56 - 13.IV.56	1,5	1
1.III.57 - 2.III.57	0	2,5

Badania powyższe wydają się wskazywać, że liofilizacja, zabezpieczając wprawdzie tylko częściowo stałość cech biochemicznych, jest bardzo dobrą metodą przechowywania kultur dekstranotwórczych *L. mesenteroides*. Przede wszystkim dzięki temu, że w przeważającej ilości przypadków zdolność dekstranotwórcza bakterii po liofilizacji jest wyższa niż przed liofilizacją.

LITERATURA

Januszewicz I., 1955: Zmiany własności biochemicznych szczepu *L. mesenteroides* w zależności od różnych warunków przechowywania. *Acta Microbiol. Polon.*, **4**: 205.

Kaniuga B., 1956: Opracowanie metod mikrobiologicznej i chemicznej kontroli przebiegu fermentacji dekstranowej oraz produktu końcowego. Instytut Przemysłu Fermentacyjnego. (Praca niepublikowana.)

I. Januszewicz

EFFECT OF STORAGE CONDITION ON CHANGES IN BIOCHEMICAL PROPERTIES OF *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES*

Summary

It was shown that dextran production by *L. mesenteroides* during storage on laboratory media is decreasing.

The storage by freeze-dry method gaves much better results. Nevertheless some biochemical properties of bacteria were changed. Due to this, *pH* of culture medium and content of yeast autolysate should be also changed.

In most cases the yield of dextran of strains after storage in freeze-dry state was higher than before (table I, II fig. 1 and 2).

It is the author's conclusion that storage of bacteria in freeze-dried state is a selective factor, eliminating cells with low metabolic activity and low power of dextran production.

The strain was obtained which gaves maximal yield of dextran already after 3-3,5 days of fermentation instead of 6-6,5 days.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 377—401

B. Czarnocka-Roczniakowa

PRÓBY OTRZYMANIA BIOMASY PACIORKOWCÓW MLEKOWYCH Z SERWATKI *

Z Zakładu Mikrobiologii Technicznej SGGW w Warszawie
Wpłynęło dnia 2 maja 1957

WSTĘP

Opracowanie metody otrzymywania masy komórkowej bakterii mlekowych może mieć duże znaczenie dla wielu kierunków przemysłu mleczarskiego.

W powszechnie stosowanych metodach wyrobu masła fermentację śmietanki wywołuje się przez dodatek zakwasu z czystych kultur paciorkowców mlekowych. Prowadzone w warunkach produkcyjnych zakwasy często wykazują silne zakażenia obcą mikroflorą (Buhrgard, 1954) oraz osłabienie zdolności ukwaszania i tworzenia związków aromatyzujących (Hammer i Babel, 1943).

Zastosowanie masy komórkowej, dodawanej bezpośrednio do śmietanki, pozwoliłoby na ograniczenie możliwości zakażenia i zaburzeń w fermentacji. Zastąpienie zakwasów masą komórkową przyczyniłoby się również do uproszczenia procesu technologicznego wyrobu masła. Wydaje się też, że zastosowanie masy komórkowej bez składników podłoża może mieć duże znaczenie w wyrobie masła metodami ciągłymi. Analogicznie jak w maślarstwie, masa komórkowa odpowiednich szczepów bakterii mlekowych mogłaby być z korzyścią stosowana i w innych działach przerobu. Zastosowanie jej uprościłoby produkcję kwasu mlekowego wyższego gatunku. Ponadto, przez zwiększenie ilości dodawanych komórek, można by skrócić czas fermentacji, co w produkcji ma istotne znaczenie. Szczepionki w formie masy komórkowej mogłyby być również stosowane do wyrobu mlecznych napojów fermentowanych. W piekarnictwie, zastąpienie zakwasów masą komórkową pozwoliłoby na uproszczenie wyrobu ciasta, ograniczenie możliwości zakażenia i poprawę smaku i aromatu gotowego produktu.

* Praca dyplomowa wykonana pod kierunkiem doc. mgr R. Majchrzaka.

Na koniec, badania nad antybiotykami wytwarzanymi przez paciorkowce mlekowe (Mattick i Hirsch, 1947, Petteé i Kooy, 1953) nasuwają myśl, że nagromadzenie odpowiednich szczepów umożliwi produkcję tych antybiotyków.

PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

WYKORZYSTANIE SERWATKI DO HODOWLI DROBNOUSTROJÓW

Duże znaczenie ekonomiczne ma zagadnienie właściwego wykorzystania serwatki, głównego produktu odpadkowego w mleczarstwie.

Jednym z nowocześniejszych sposobów jej zużytkowania jest produkcja biomasy. Zawartość w serwatce laktozy, substancji azotowych, soli mineralnych i witaminów (Pijanowski, 1946) zapewnia dobry rozwój wielu często bardzo wymagających mikroorganizmów. Do produkcji biomasy z serwatki wykorzystywane są określone gatunki drobnoustrojów, zdolne do wykorzystania laktozy. Siman (1950) rozróżnia 3 sposoby zużytkowania serwatki na produkcję biomasy: 1) produkcja ziarn kefirowych, 2) rozmnażanie pleśni, tzw. sposób „biosynowy", 3) produkcja „serwatkowych" drożdży. Do produkcji ziarn kefirowych stosowana jest zarówno serwatka podpuszczkowa jak i kwasowa, nadaje się również serwatka zagęszczona (do 11% cukru mlekowego).

Do rozmnażania pleśni stosuje się zwykle rodzaje *Fusarium* i *Oidium* wykorzystujące laktozę, Fabel (1949) jednakże podkreśla korzyści przeprowadzenia hydrolizy cukru mlekowego w serwatce. Związki azotowe serwatki muszą być uzupełniane.

Do biosyntezy drożdży stosuje się szczepy *Torula utilis*.

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA WZROST KULTUR BAKTERII MLEKOWYCH

Odżywianie

Zapotrzebowanie pokarmowe bakterii mlekowych badane było wielokrotnie. Andersen i Elliker (1953) podkreślają rolę peptydów jako źródła azotu dla paciorkowców mlekowych (izolowanych z zakwasów). Autorzy ci stwierdzili równocześnie, że przy zwiększeniu zawartości peptydów w mleku zwiększała się ilość komórek paciorkowców mlekowych i ilość wytwarzanego kwasu mlekowego. Na znaczenie polipeptydów w odżywianiu bakterii mlekowych, zwłaszcza pałeczek, zwracają uwagę Szaposznikow i Manteufel (1923), zalecając dodawanie do podłoża wyciągu z mąki, fasoli lub wyki. Jednocześnie autorzy ci podkreślają szkodliwy wpływ denaturacji cieplnej białek. Ritter (1954) podaje, że dobry wzrost paciorkowców mlekowych dają peptony, nie wiadomo jednak jakie składniki są najważniejsze dla wzrostu. W wielu wypadkach nie wie się również, jaki jest przy tym udział witaminów i czynników wzrostowych. Autor podkreśla, że niektóre peptony mogą działać hamująco. Według Jerusalimskiego (1949) dla bakterii mlekowych, jako organizmów aminoheterotrofowych, najlepszym pożywieniem azotowym są produkty dalej posuniętej hydrolizy białka, np. kazeina hydrolizowana, którą jednak należy uzupełniać tryptofanem. Bogdanow (1953) zaleca mleko hydrolizowane. Autolizat drożdży również jest uważany za dobre źródło azotu. Amoniak nie może służyć jako źródło azotu dla bakterii mlekowych, ale

w obecności potrzebnych aminokwasów polepsza wzrost. Przypuszcza się, że zużywany jest do syntezy aminokwasów (Ritter, 1954).

Bakterie mlekowe należą do najbardziej wymagających organizmów pod względem zapotrzebowania na czynniki wzrostowe i specyficzne substancje odżywcze. Zapotrzebowanie bakterii mlekowych na witaminy badał Ritter (1953). Möller (1950) podkreśla znaczenie tiaminy i kwasu pantotenowego. Autor podaje, że koncentracje, w których witaminy te wywołują maksymalny wzrost, wahają się w granicach 10^{-5}-10^{-12} g/ml. Obermanowa (1955) badając wymagania pokarmowe aromatyzujących paciorkowców mlekowych stwierdziła, że *S. diacetilactis* charakteryzował się zdolnością syntetyzowania riboflawiny, kwasu foliowego i biotyny. Natomiast brak jakiegokolwiek witaminu grupy B powodował zahamowanie wzrostu nieokreślonych bliżej paciorkowców aromatyzujących, świeżo wyizolowanych z kefiru. Autorka badała również zapotrzebowanie na witaminy dwóch typów *Th. Delbrücki*. Badania potwierdziły pogląd, według którego drobnoustroje pochodzące z tego samego środowiska mają podobne wymagania pokarmowe. Poza znanymi czynnikami wzrostowymi bakterii mlekowych, jak witaminy kompleksu *B*, zasady purynowe i pirymidynowe oraz niektóre aminokwasy, opisano wpływ nieznanych bliżej związków; między innymi stwierdzono pobudzające działanie nieokreślonego bliżej związku wydobytego z osocza krwi (Ber, 1950). Kennedy, Speck i Aurand (1954) opisują nie znany przedtem stymulujący czynnik w wywarze ze zbóż. W celu otrzymania dobrego wzrostu bakterii mlekowych polecany jest dodatek do podłoża różnych związków kompleksowych. Według Jerusalimskiego (1949) dobre rezultaty dają autolizaty drożdży piwnych i piekarnianych, wyciągi z otrąb, kiełków słodowych, zielonych liści, sok z ziemniaków. Wyciąg z nasion soi i odgoryczonej mączki sojowej mają wybitnie pobudzać wzrost bakterii mlekowych. Jago (1954) podaje, że substancje pobudzające rozwój paciorkowców mlekowych, jak np. wyciągi z wątroby czy drożdży, konkurują z występującymi w mleku inhibitorami. Diethelm (1932), w celu nagromadzenia biomasy paciorkowców mlekowych, stosował jako podłoże serwatkę z dodatkiem 10% autolizatu drożdży. Po 48 godzinach uzyskiwał 10-12 g masy komórkowej z 20 l podłoża.

Wpływ temperatury

Według Snella (1950) temperatura hodowli, jeśli tylko jest dostatecznie bliska optymalnej, prawdopodobnie nie ma decydującego znaczenia dla wzrostu kultur. Autor podkreśla jednak znaczenie hodowli w stałej temperaturze. Według Matuszewskiego (1947), w temperaturach niższych otrzymuje się z reguły wyższy plon komórek, wzrost kultur jest jednak bardzo powolny. Według Dornera i Rhana (1939, Dorner, Demond i Chawannes, 1942) największą ilość komórek *S. lactis* otrzymuje się w temperaturze 25-30 , a najszybszą fermentację w 40°.

Wpływ *pH*

Wpływ *pH* na rozwój kultur bakteryjnych jest podkreślany przez wielu autorów. Stephenson (1949) zwraca jednak uwagę na błędne ujęcie większości publikowanych prac, w których nie bierze się pod uwagę szybkich zmian *pH* w czasie hodowli. Matuszewski (1947) otrzymał na mleku o stałym *pH* 3,6 miliarda komórek *S. lactis*, podczas gdy w próbie kontrolnej maksymalny plon wynosił 1 miliard. Longsworth i Mac Innes (1935) z *L. acidophilus* przy stałym

pH 6,8, otrzymali dwukrotnie wyższą ilość kwasu mlekowego niż w hodowli o zmiennym *pH*. Według Snella (1950) duże nagromadzenie biomasy bakterii mlekowych można uzyskać przez zbuforowanie podłoża, przy czym rodzaj i ilość zastosowanego roztworu buforującego powinny być odpowiednie dla danego gatunku.

Przewietrzanie środowiska

Według Stephenson (1949) aeracja jest jednym z ważniejszych czynników wpływających na plon bakterii tlenowych i względnie beztlenowych. Dagley, Morrison i Dawes (1951) podkreślają, że wpływ aeracji na rozwój względnych beztlenowców jest wciąż problemem otwartym; wyniki z tego zakresu są często rozbieżne. Schultz (1946) w doświadczeniach z „grzybkami" kefirowymi stwierdził, że aeracja powoduje zachwianie symbiozy: zahamowanie rozmnażania bakterii mlekowych i nadmierny rozwój drożdży, co prowadzi do zaniku ziaren kefirowych. Autor otrzymał najlepszy plon „grzybków" przy stałym mieszaniu środowiska i ograniczonym dostępie powietrza. Matuszewski (1947) cytuje doświadczenia nad wpływem przewietrzania na plon komórek *S. lactis*: na mleku nie wietrzonym plon wynosił 3,6 miliarda komórek w 1 ml, natomiast na mleku przewietrzanym 5,2 miliarda; w doświadczeniu było zachowane stałe *pH* podłoża. Snell (1950) nie przypisuje większego znaczenia aeracji w uzyskaniu dobrego rozwoju bakterii mlekowych, zarówno mikroaerofilów jak i względnych beztlenowców. Stwierdzono, że przy przewietrzaniu kultur paciorkowców mlekowych wytwarza się mniej kwasu mlekowego. White i Sherman (według Hammera, 1948) stwierdzili, że w warunkach silnej aeracji *S. lactis* wytwarza 11-65% kwasu mlekowego z fermentowanej glukozy, podczas gdy przy ograniczonym dostępie powietrza ilość ta wynosi ponad 95%.

Wielu autorów podkreśla rolę dwutlenku węgla jako czynnika wzrostu. Wykazano stymulujący wpływ CO_2 na plon komórek *S. haemolyticus* (Pappenheimer i Hottle, 1940). Jednocześnie stwierdzono, że przy większym ciśnieniu CO_2 dodatek kwasu adenilowego, jako czynnika wzrostu, okazał się zbędny. Zaobserwowano również, że *L. arabinosus* i *S. faecalis*, w atmosferze zawierającej 6% CO_2 mogą obchodzić się bez pewnych aminokwasów, które w normalnych warunkach są dla nich konieczne (Stephenson, 1949).

Ilość wysiewu

Decydująca rola ilości wysiewanych komórek kultury macierzystej we wzroście populacji jest powszechnie znana. Przy dużych wysiewach osiąga się łatwiej sprzyjający potencjał oksydoredukcyjny, reakcję środowiska oraz szybszą hydrolizę polipeptydów i polisacharydów. Ponadto, przy dużym wysiewie zawartość czynników wzrostowych w wysiewie może stanowić bodziec dla szybszego rozwoju kultury. (Jerusalimski, 1949). Hammer i Babel (1943) podają, że dla dobrego rozwoju paciorkowców mlekowych hodowanych na mleku wystarcza wysiew 0,25 - 1%.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

W celu namnożenia komórek paciorkowców mlekowych przebadano szereg czynników ustalając ich wpływ na plon badanych szczepów.

Doświadczeniami objęte były następujące czynniki:

1. Sposób przygotowania serwatki (klarowanie, wyjaławianie, początkowe *pH*).
2. Faza wzrostu kultury macierzystej.
3. Ilość wysiewu.
4. Odżywianie (rozcieńczenie serwatki, dodatek związków azotowych, dodatek laktozy, hydroliza laktozy, stosunek węgla do azotu w podłożu, dodatek związków kompleksowych zawierających czynniki wzrostowe).
5. Wiązanie kwasu mlekowego węglanem wapnia.
6. Przewietrzanie środowiska.
7. Hodowla w atmosferze CO_2.
8. Ruch mechaniczny środowiska.

Następnie przeprowadzono próby namnożenia komórek i ustalenia maksymalnego plonu.

Zakończeniem części doświadczalnej było oznaczenie wagowe otrzymanej masy komórkowej, przeprowadzenie bilansu suchej masy i azotu oraz oznaczenie stopnia wykorzystania laktozy.

METODYKA BADAŃ

Badane szczepy hodowano w jednakowych probówkach, do których odmierzano po 8 ml pożywki (wyjątek stanowią doświadczenia z wiązaniem kwasu mlekowego, przewietrzaniem, CO_2 i ruchem mechanicznym). Podłoże szczepiono jednakową ilością kultury macierzystej (do czasu ustalenia ilości wysiewu — 3-4 krople 24-godzinnej kultury). We wszystkich doświadczeniach rozmnażanie szczepów prowadzono w temperaturze 25°.

1. Przygotowanie serwatki

Stosowano serwatkę podpuszczkową otrzymaną w laboratorium z odtłuszczonego mleka rynkowego.

Klarowanie serwatki. Albuminę i globulinę wytrącano w temperaturze wrzenia przy użyciu 2-procentowego kwasu octowego, 2-procentowego kwasu mlekowego i 10-procentowego chlorku wapnia w ilości 20 ml/l.

Wyjaławianie serwatki. Przygotowano 5 kolejnych próbek pasteryzowanej serwatki, zaczynając od jednorazowej pasteryzacji, a kończąc na pięciokrotnej. Serwatkę pasteryzowano w 96° przez 20 minut, co 12 godzin. Jednocześnie przeprowadzono doświadczenie na serwatce sterylizowanej w 110°, 115° i 120° przez 20 minut. Na tak przygotowanej serwatce rozmnażano badane szczepy i oznaczano plon komórek. Ponadto zbadano szybkość wzrostu *S. lactis* hodowanego na serwatce pasteryzowanej i tyndalizowanej.

pH serwatki. Po wytrąceniu kwasem octowym białek serwatki nastawiano *pH* przy użyciu papierków wskaźnikowych Ly-phan. Poniżej *pH* 5,4 nastawiano kwasem octowym, wyższe *pH* wodorotlenkiem sodu. Do doświadczeń użyto serwatkę o *pH* 4,6 - 7,6.

2. Faza wzrostu kultury macierzystej.

Doświadczenie przeprowadzono ze szczepem *Streptococcus lactis* w 2 powtórzeniach. Hodowlę prowadzono przez 58 godzin. W określonych odstępach (przez pierwszych 10 godzin co godzinę lub dwie) oznaczano plon komórek. W celu określenia faz wzrostu sporządzano wykres wzrostu komórek w zależności od czasu hodowli. Z fazy logarytmicznej i fazy zamierania dokonano wysiewów dla zbadania krzywych wzrostu kultur potomnych. W czasie doświadczenia zachowano jednakowe warunki rozwoju komórek w kulturze macierzystej oraz w środowisku, do którego były wysiane.

3. Ilość wysiewu kultury macierzystej

Do szczepienia użyto kultur w logarytmicznej fazie wzrostu. Stosowano wysiewy: 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,5 i 10,0 ml kultury na 100 ml serwatki. Plon komórek oznaczano po 32 godzinach.

4. Odżywianie

Rozcieńczenie serwatki. Doświadczenie to poprzedzone było oznaczeniem w serwatce azotu, laktozy, popiołu i suchej masy. Zastosowano rozcieńczenia serwatki: 1, 2, 5, 10, 15, 25 i 40. Graniczne rozcieńczenie 40 obliczano na podstawie przybliżonego składu chemicznego komórek bakterii zakładając, że komórki bakterii stanowią 1‰ podłoża oraz stosując mnożnik 5. W próbach równoległych azot uzupełniano peptonem w ilości 1‰ (w peptonie uprzednio oznaczono zawartość azotu).

Dodatek związków azotowych i laktozy. Jako źródła azotu dodawano pepton i kazeinę hydrolizowaną (bezwitaminową). Pepton i kazeinę dodawano do serwatki w ilościach 0,1 - 2,5%. Analogicznie postępowano przy dodatku laktozy.

Hydroliza laktozy. Jako podłoże użyto wody drożdżowej z laktozą (1,5%) oraz glikozą i galaktozą (razem 1,5%).

Stosunek węgla do azotu w podłożu. Próby ustalenia optymalnego stosunku węgla do azotu przeprowadzono na podłożach przygotowanych z melasu po wyrobie laktozy. Próbki melasu rozcieńczano w stosunku takim, by zawartość substancji białkowych była taka sama jak w serwatce. W ten sposób otrzymano serwatkę o zmniejszonej ilości węgla (węgiel obliczano wyłącznie z zawartości cukru). Następnie przez dodatek odpowiednich ilości laktozy przygotowano szereg podłóż o różnej zawartości cukru, a tym samym różnym stosunku C : N. Maksymalną ilość dodawanej laktozy obliczano tak, by była taka sama jak w serwatce „naturalnej". W celu uzyskania lepszego wzrostu, do podłóż sporządzonych z melasu, w próbach równoległych dodawano 2% wyciągu z drożdży.

Dodatek związków kompleksowych. Próby przeprowadzono z następującymi związkami kompleksowymi: preparaty z drożdży (autolizaty z drożdży piekarnianych i piwnych odgoryczonych i nieodgoryczonych, ekstrakt z drożdży piekarnianych), preparaty z ziaren kefirowych (autolizat i ekstrakt), wyciąg z kiełków słodowych, nasion fasoli i wyciąg z liści szpinaku.

Autolizaty drożdży przygotowywano według *Jerusalimskiego* (1949). Dla umożliwienia porównania wartości drożdży piekarnianych z drożdżami piwnymi odgoryczonymi i nieodgoryczonymi ilość dodawanej wody obliczano tak, by zawartość suchej masy w tych trzech autolizatach była jednakowa. Drożdże odgoryczano przez płukanie strumieniem bieżącej wody z równoczesnym przewietrzaniem, (używano „gęstwy" drożdżowej z browaru). Ekstrakt z drożdży przygotowywano według przepisu podanego przez Stelling-Dekker (1931). Preparaty z ziarn kefirowych sporządzano analogicznie jak z drożdży. Ziarna kefirowe przed przygotowaniem wyciągów rozcierano z piaskiem. Wyciąg z kiełków

słodowych otrzymywano przez gotowanie suszonych kiełków z wodą (100 g kiełków na 500 l wody). Do przygotowywania wyciągu z fasoli używano skiełkowanych nasion, które poddawano autolizie w 50° przez 24 godziny. Ekstrakt otrzymywano przez gotowanie z wodą. Wyciąg z liści szpinaku robiony był na zimno. Dokładnie roztarte z piaskiem liście zalewano wodą i pozostawiano w 4° przez 12 godzin, po przefiltrowaniu wyciąg pasteryzowano. Wszystkie preparaty przechowywano w butelkach z ciemnego szkła w 4°. Poszczególne związki kompleksowe dodawano w różnym stosunku do serwatki przed szczepieniem. Ustalono wpływ tych preparatów na plon komórek oraz optymalną dawkę, a następnie porównano działanie wszystkich stosowanych związków kompleksowych.

5. Wiązanie kwasu mlekowego węglanem wapnia.

Przed szczepieniem dodawano różne ilości sterylizowanego węglanu wapnia. Maksymalny dodatek obliczano na podstawie zawartości laktozy w serwatce (4,8%). Dodatek węglanu wynosił: 2,7 2,0 1,0 i 0,5 g na 100 ml serwatki. Ponadto przeprowadzono próbę z stopniowym dodatkiem $CaCO_3$ w miarę wiązania go przez tworzący się kwas mlekowy. Wszystkie próbki były często mieszane w czasie hodowli. Przed oznaczeniem plonu komórek (nefelometrycznie) niezwiązany węglan wapnia rozpuszczano kwasem solnym.

6. Przewietrzanie środowiska.

7. Hodowla w atmosferze dwutlenku węgla.

8. Ruch mechaniczny środowiska (przy ograniczonym dostępie powietrza).

Ze względu na to, że zarówno przewietrzanie jak i przedmuchiwanie CO_2 wywołują równoczesne mieszanie kultury, wpływ tych trzech czynników badany był jednocześnie, przy czym warunki doświadczeń różniły się tylko wymienionymi parametrami. Przewietrzanie prowadzono w płuczkach gazowych z filtrem Schotta. Powietrze zasysane przez pompkę próżniową przeprowadzano przez filtr z waty, a następnie przez 50-procentowy kwas siarkowy. Do gaszenia piany używano oleju fermentacyjnego (1 - 3 krople w ciągu doświadczenia). Przewietrzanie prowadzono bez przerwy do osiągnięcia maksymalnego plonu komórek (48 - 72 godzin).

Hodowlę w atmosferze CO_2 prowadzono w płuczkach gazowych dołączonych do butli z gazem. Dopływ CO_2 regulowano tak, by ilość gazu była możliwie mała. Podobnie jak w doświadczeniu z przewietrzaniem, kulturę w czasie hodowli można było porównać do łagodnie wrzącej cieczy.

W doświadczeniu nad wpływem ruchu mechanicznego zastosowano mieszanie kultury przy ograniczonym dostępie powietrza.

Rozmnażanie szczepów prowadzono w cylindrach zamkniętych czopami fermentacyjnymi z wmontowanymi szklanymi mieszadłami tak, by górna część czopu obracała się wraz z mieszadłem. Czopy napełniano 50-procentowym kwasem siarkowym (Majchrzak, 1935). Dla zabezpieczenia przed zakażeniem brzegi cylindra zalewano parafiną.

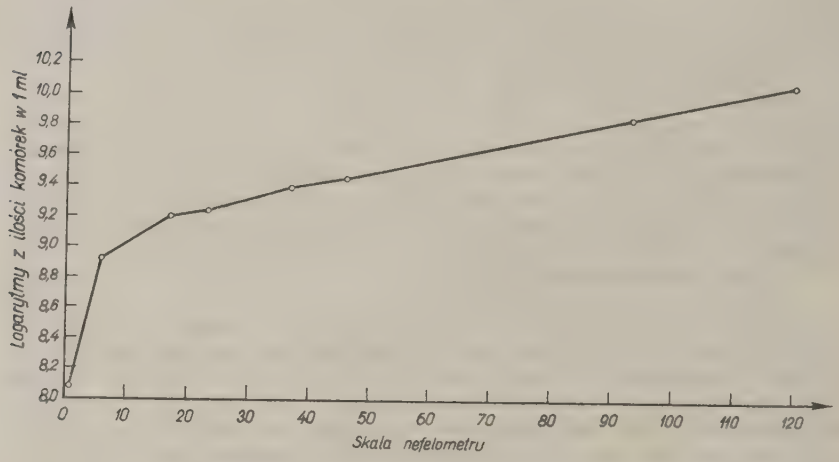
Otrzymywanie masy komórkowej

Masę komórkową oddzielano od podłoża w końcowych próbach. Otrzymywano ją przez kilkakrotne wirowanie rozcieńczonego materiału, przy 6000 obrotach na minutę. Po oddzieleniu osadu rozpuszczano zawarty w nim niezwiązany węglan wapnia kwasem solnym, następnie rozcieńczano i wirowano jeszcze trzykrotnie.

Plon komórek oznaczano nefelometrycznie. Używano nefelometru bakteriologicznego, umożliwiającego oznaczenie stopnia zmętnienia kultury bezpośrednio z wychyleń wskazówki galwanometru. Zależność między skalą nefelometru a ilością

komórek badanych paciorkowców w 1 ml serwatki podaje krzywa na rys. 1. Punkty krzywej otrzymano przez określenie stopnia zmętnienia kolejnych rozcieńczeń kultury o znanej ilości komórek (użyto kultury *S. lactis* na serwatce).

Badany materiał rozcieńczano serwatką. Komórki liczono metodą bezpośrednią Majchrzaka (1947). Metoda ta polega na liczeniu komórek w preparacie nieutrwalonym, co pozwala na uniknięcie błędu mogącego powstać na skutek



Rys. 1. Krzywa nefelometru dla paciorkowców mlekowych
Fig. 1. Nephelometric curve for lactic streptococci

spłukiwania preparatu po barwieniu. W toku pracy sprawdzano kilkakrotnie wyniki nefelometrycznych oznaczeń przez liczenie komórek. Odchylenia nie przekraczały 15%. Azot w podłożach oznaczano metodą Kjeldahla, cukier metodą Bertranda, suchą masę metodą wagową, popiół przez spalanie z ługowaniem. W przeprowadzanym bilansie, azot oznaczano w serwatce wyjściowej, masie bakteryjnej i serwatce „resztkowej" jodometrycznie, mikrometodą Reifera i Tarnowskiej (1950). Kwasowość kultur oznaczano w stopniach *SH*, *pH* przy użyciu papierków wskaźnikowych Ly-phan. Obecność acetoiny i dwuacetylu stwierdzano próbą Voges-Proskauera.

Charakterystyka badanych szczepów

Badania prowadzono z następującymi szczepami: 1) *Streptococcus lactis*, 2) *Streptococcus cremoris*, 3) Nieokreślony bliżej heterofermentatywny szczep paciorkowca mlekowego (zbliżony do *S. diacetilactis*), oznaczany jako szczep „*A*".

Szczepy te otrzymano z Wytwórni Czystych Kultur Mleczarskich w Olsztynie. *S. lactis* ukwaszał mleko do 44° *SH*, przy czym skrzep występował już po 10 - 12 godzinach. *S. cremoris* ścinał mleko po 12 - 16 godzinach, ukwaszał je do 35° *SH*. Szczep *A* odznaczał się zdolnością do tworzenia związków aromatyzujących (acetoiny i dwuacetylu), z jednoczesnym ukwaszaniem mleka (do 35° *SH*).

W próbie Voges-Proskauera kultura na mleku dawała intensywne różowe zabarwienie, pojawiające się przed upływem minuty. Bliższej diagnostyki tego szczepu nie przeprowadzono. Cechy morfologiczne opisanych szczepów były typowe dla reprezentowanej przez nie grupy bakterii mlekowych. *S. lactis* i szczep *A* tworzyły dwoinki i krótkie łańcuszki złożone z okrągłych lub nieco wydłużonych komórek o średnicy około 0,8 μ. *S. cremoris* odznaczał się dłuższymi łańcuszkami i nieco większymi komórkami (około 1 μ). Na agarze wszystkie szczepy tworzyły jednakowe kolonie: drobne (⌀ 1 - 2 mm), soczewkowate, białe, matowe, o brzegu gładkim.

Cechy morfologiczne, zdolność ukwaszania mleka oraz zdolność szczepu *A* do tworzenia związków aromatyzujących były wielokrotnie sprawdzane w toku wykonywanych prac.

WYNIKI

WPŁYW SPOSOBU PRZYGOTOWANIA PODŁOŻA NA PLON KOMÓREK BADANYCH SZCZEPÓW

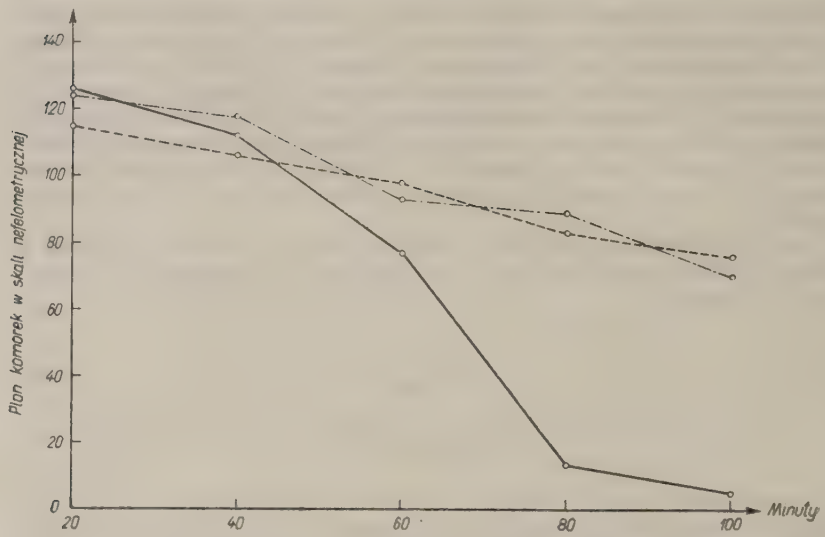
Zastosowane sposoby klarowania serwatki nie wpłynęły na plon komórek; u wszystkich szczepów plon wahał się w wąskich granicach (106-112 w skali nefelometru).

W doświadczeniach z różnymi sposobami termicznego wyjaławiania serwatki obserwowano wyraźny wpływ denaturacji podłoża na ogólny plon komórek. Tabela I podaje plon komórek badanych szczepów na serwatce sterylizowanej w różnych temperaturach. Krzywa na rys. 2 ilustruje wpływ tyndalizacji serwatki na plon komórek badanych szczepów. Rys. 3 przedstawia wpływ pasteryzacji i tyndalizacji na szybkość wzrostu *S. lactis*.

Cztero i pięciokrotna pasteryzacja i sterylizacja w 120° powodowały wyraźne zmiany serwatki (zbrunatnienie, posmak karmelowo-słodowy).

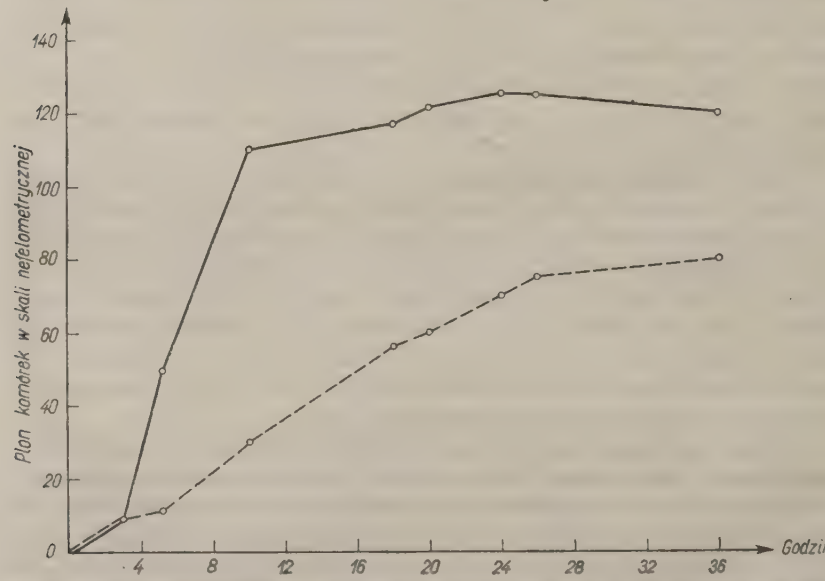
Najbardziej wrażliwy na zmiany podłoża, wywołane działaniem wysokiej temperatury, okazał się *S. lactis*; rozwój tego szczepu na serwatce pasteryzowanej pięciokrotnie był ledwo widoczny, a na serwatce sterylizowanej w 120° bardzo słaby. Przyjmując plon komórek na serwatce pasteryzowanej za 100, na serwatce tyndalizowanej (trzykrotnie pasteryzowanej) plon *S. lactis* wynosił 62, a po pięciokrotnej pasteryzacji zaledwie 5 (prawie zupełne zahamowanie wzrostu).

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że dużą rolę odgrywa też czas działania temperatury, co potwierdza fakt, że ostrożna sterylizacja jest korzystniejsza od tyndalizacji. Denaturacja serwatki wpłynęła nie tylko na ogólny plon komórek, lecz powodowała również opóźnienie wzrostu *S. lactis* (rys. 3). Na serwatce pasteryzowanej po 10 godzinach hodowli otrzymano 92% maksymalnego plonu komórek, podczas gdy na serwatce tyndalizowanej zaledwie 37%.



Rys. 2. Wpływ tyndalizacji serwatki na plon komórek badanych szczepów. ——— *S. lactis*, — — — — *S. cremoris*, —.—.— Szczep (strain) *A*.

Fig. 2. Effect of heat sterilisation of whey on yield of streptococci cells



Rys. 3. Wpływ pasteryzacji i tyndalizacji serwatki na szybkość wzrostu *Streptococcus lactis*

Fig. 3. Effect of heat sterilisation of whey on growth rate of lactic streptococci
——— Serwatka pasteryzowana — Whey pasteurised.
— — — — Serwatka tyndalizowana — Whey sterilised by tyndallisation

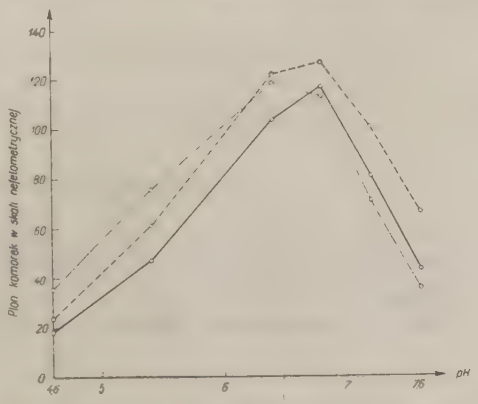
Tabela I

Wpływ temperatury sterylizacji serwatki na plon komórek *S. lactis*
Effect of temperature of sterilisation of whey on the yield of *S. lactis* cells

Temperatura sterylizacji / Temperature of sterilisation	Plon komórek w skali nefelometru / Yield of cells - scale nephelometric		
	S. lactis	*S. cremoris*	*A*
110°	107	108	100
115°	90	98	92
120°	27	59	82

W kulturach na serwatce pasteryzowanej w 96° przez 20 minut i sterylizowanej w 110° przez 20 minut nie stwierdzono zakażenia ani mikroskopowo, ani na płytkach kontrolnych. Przy skróceniu czasu zarówno pasteryzacji, jak i sterylizacji do 15 minut, obserwowano obecność ruchomych pałeczek.

Ujemny wpływ denaturacji białek podłoża na rozwój bakterii mlekowych podkreśla wielu autorów. Szaposznikow i Manteuffel (1923) stwierdzili zupełne zahamowanie wzrostu *Thermobacterium cereale* na sterylizowanym i tyndalizowanym wyciągu z wyki; pożywka ta po ostrożnej pasteryzacji dała wzrost bardzo dobry. Pimienowa (według Szaposznikowa, 1951) stwierdziła że wyjaławianie pożywki związane z denaturacją białek prowadzi do znacznego obniżenia natężenia fermentacji mlekowej. Otrzymane wyniki potwierdzają te prace.

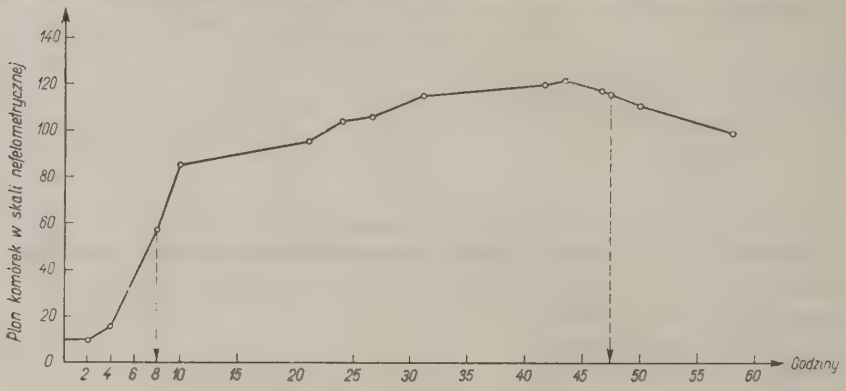


Rys. 4. Wpływ początkowego *pH* serwatki na plon komórek badanych szczepów.
——— *S. lactis*, — — — — *S. cremoris*,
—.—.— Szczep (strain) *A*

Fig. 4. Effect of initial *pH* of whey on yield of lactic streptococci

Przedstawione graficznie na rys. 4 wyniki wskazują na wyraźny wpływ początkowego *pH* podłoża na plon badanych szczepów. Przy *pH* 4,6 uzyskano plon bardzo niski, w miarę podwyższania do 6,6-6,8 nastąpiło zwiększenie ilości komórek. W granicach *pH* 6,8-7,6 stosunek osiągniętego plonu do wartości *pH* był odwrotnie proporcjonalny.

W oparciu o podane wyniki ustalono sposób przygotowania serwatki do dalszych doświadczeń: albuminę i globulinę wytrącano w temperaturze wrzenia 2% kwasem octowym (20 ml/l), *pH* nastawiano przy pomocy NaOH do 6,8, filtrowano i pasteryzowano w 96° przez 20 minut.

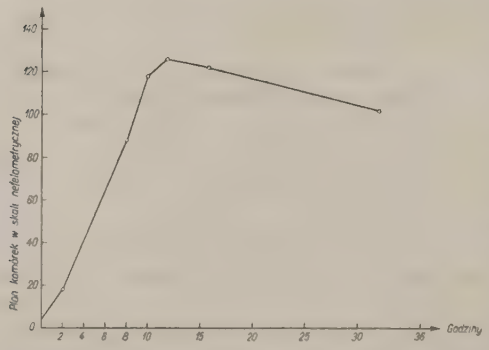


Rys. 5. Krzywa wzrostu kultury macierzystej *Streptococcus lactis*
Fig. 5. Growth curve of mother culture of *S. lactis*

FAZA WZROSTU KULTURY MACIERZYSTEJ

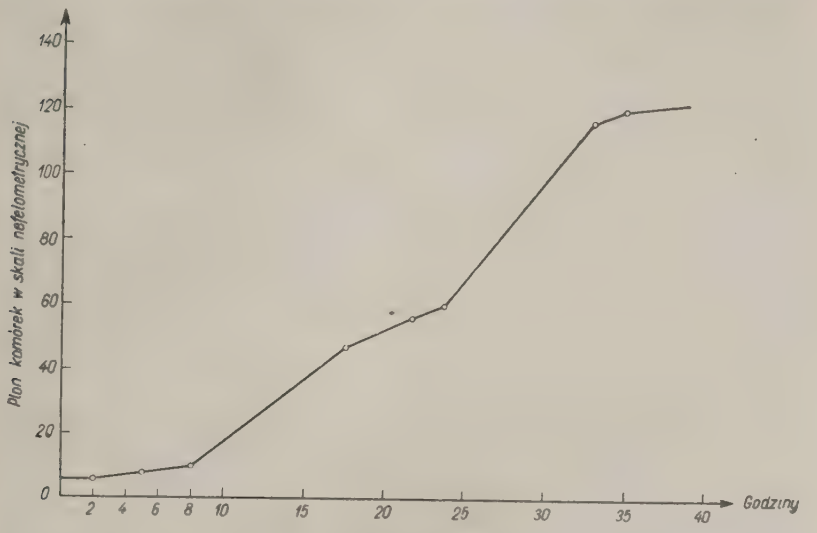
Rysunek 5a przedstawia krzywą wzrostu *S. lactis*, rysunek 5b i 5c wzrost kultur „potomnych" otrzymanych przez szczepienie z fazy logarytmicznej i fazy zamierania.

Wyniki doświadczenia wskazują na wybitny wpływ „wieku" użytej do szczepienia kultury na szybkość wzrostu *S. lactis* (rys. 5b, c). W wypadku użycia 8-godzinnej kultury (w logarytmicznej fazie wzrostu) otrzymano maksymalny plon po 12 godzinach, przy czym prawie od razu uzyskano logarytmiczną fazę wzrostu. Natomiast przy szczepieniu tą samą kulturą 48-godzinną (w fazie zamierania), maksymalny plon osiągnięto w czasie 3,5 raza dłuższym, bo dopiero



Rys. 5a Krzywa wzrostu kultury potomnej, *Streptococcus lactis*, szczepionej z fazy logarytmicznej.
Fig. 5a. Growth curve of culture of *S. lactis* inoculated with cells from logarithmic phase of growth

po upływie 42 godzin. Różnicę tę podkreśla jeszcze fakt, że kultura 8-godzinna, zawierała o połowę mniej komórek niż 48-godzinna, a w obydwu wypadkach do szczepienia brano jednakowe (objętościowo) ilości



Rys. 5b. Krzywa wzrostu kultury potomnej *Streptococcus lactis*, szczepionej z fazy zamierania.

Fig. 5b. Growth curve of culture of *S. lactis* inoculated with cells from logarithmic death phase of growth

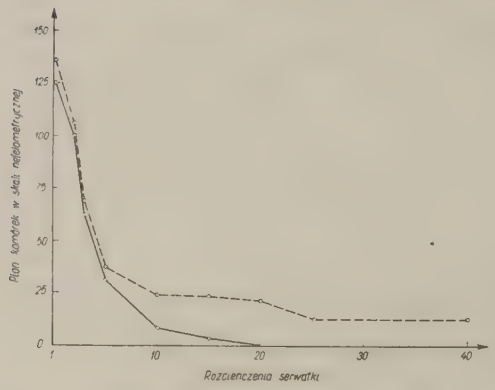
kultury macierzystej. Różnicy w wielkości maksymalnego plonu nie obserwowano.

WPŁYW ILOŚCI WYSIEWANEJ KULTURY MACIERZYSTEJ

W doświadczeniu tym użyto do szczepienia kulturę będącą w logarytmicznej fazie wzrostu (10-godzinna). Wyniki wskazują na widoczny wpływ ilości wysiewu. Przy wysiewie niższym niż 2%, w stosunku do objętości podłoża, obserwowano znaczne obniżenie plonu (średnio o 38%). Przy wysiewie większym niż 7,5% widoczne było u wszystkich szczepów pewne obniżenie ilości komórek, co mogło być spowodowane wprowadzeniem z kulturą macierzystą produktów metabolizmu. Jest zupełnie prawdopodobne, że przy użyciu do szczepienia masy komórkowej odseparowanej od podłoża można osiągnąć dalsze podwyższenie plonu wraz ze zwiększeniem ilości dodawanych komórek.

ODŻYWIANIE

Rozcieńczenie serwatki. Serwatka użyta do doświadczenia zawierała w 1 litrze: węgla 20 g, azotu 0,61 g, popiołu 4,5 g. Węgiel obliczano wyłącznie z zawartości glikozy. Stosując graniczne rozcieńczenie 1 : 40 otrzymano: węgla 0,5 g, azotu 0,015 g, popiołu 0,112 g. Brakującą ilość azotu 0,09 g, w próbie równoległej, uzupełniono peptonem w ilości 1 g/1000 ml, co stanowi 0,137 g azotu.



Rys. 6. Wpływ rozcieńczenia serwatki na plon komórek *Streptococcus lactis.* ———— Serwatka bez dodatku peptonu — Whey without peptone, — — — — Serwatka z dodatkiem peptonu — Whey with peptone

Fig. 8. Effect od degree of dilution of whey on yield of lactic streptococci

Plon komórek *S. lactis* w zależności od kolejnych rozcieńczeń serwatki przedstawia rys. 6. W próbach z pozostałymi szczepami otrzymano wyniki analogiczne.

Z przeprowadzonego doświadczenia wynika, że drogą rozcieńczenia podłoża nie można uzyskać zwiększenia plonu, jak to miało miejsce w nagromadzeniu masy komórkowej drożdży. Przy kolejnych rozcieńczeniach serwatki 1 : 2, 1 : 2, 1 : 5 plon komórek maleje wprost proporcjonalnie do rozcieńczenia, przy dalszych rozcieńczeniach plon obniża się, ale nie zachodzi już zależność prosta, wreszcie przy rozcieńczeniu 1 : 20 i następnych zaobserwowano u wszystkich szczepów zahamowanie wzrostu. W probówkach z dodatkiem peptonu uzyskano podobne wyniki z tą różnicą, że przy rozcieńczeniu 1 : 20 i wyższych osiągnięto jeszcze nikły wzrost komórek.

Wydaje się, że zahamowanie wzrostu przy rozcieńczeniu 1 : 20 oraz proporcjonalne zwiększanie się plonu w miarę koncentracji składników serwatki może być spowodowane wpływem określonych związków. Prawdopodobnie nie odgrywa tu roli ogólna ilość azotu, lecz jego forma, co potwierdzałaby próba z peptonem. Oddziaływać mogą tu również czynniki wzrostowe lub też określone związki mineralne.

Dodatek związków azotowych. W doświadczeniu tym nie stwierdzono wyraźnego wpływu dodatku związków azotowych na plon komórek. W próbie z peptonem obserwowano pewne podwyższenie

ilości komórek (średnio o 11%) już przy dodatku 0,1%. Dalsze zwiększenie ilości dodawanego peptonu nie powodowało już wzrostu plonu. Dodatek kazeiny hydrolizowanej (bezwitaminowej) nie wpłynął na plon *S. lactis* i *S. cremoris*, obserwowano tylko nieznaczne podwyższenie plonu (10%) szczepu aromatyzującego.

Powyższe wyniki zdają się wskazywać na rolę czynników wzrostowych w procesach wzrostu badanych szczepów. Nie jest również wykluczone, że różnica w plonie przy dodatku peptonu i kazeiny hydrolizowanej została wywołana wpływem określonej formy azotu.

Dodatek laktozy. Zwiększenie zawartości laktozy w serwatce nie spowodowało podwyższenia plonu komórek badanych szczepów.

Wpływ zawartości materiału węglowego w podłożu na wzrost kultur bakteryjnych jest podkreślany przez wielu autorów. Cytowano doświadczenia dotyczące tylko dużych rozcieńczeń, nie ma natomiast danych, jak kultury reagują na dodatek pożywienia węglowego przy większych koncentracjach.

Hydroliza laktozy. W doświadczeniu tym stwierdzono u wszystkich szczepów jednakowy rozwój na podłożu z laktozą, jak i cukrami prostymi (glikoza i galaktoza). Dlatego też prowadzenie doświadczeń z hydrolizą laktozy w serwatce uznano za niecelowe.

Opracowane metody produkcji biomasy drobnoustrojów wykorzystujących laktozę na ogół nie przewidują hydrolizy cukru mlekowego. Jedynie Fabel (1949), podając metodę produkcji masy komórkowej *Oospora lactis* z serwatki, wskazuje na korzyści przeprowadzenia hydrolizy laktozy.

Optymalny stosunek ilości węgla do azotu w serwatce. Zawartość w serwatce substancji białkowych i laktozy oraz doświadczenie nad wpływem dodatku tych związków na plon komórek wskazuje na to, że stosunek węgla do azotu w serwatce jest wysoki. Stosunek węgla do azotu w suchej masie serwatki wynosi 35, a w suchej masie komórek około 5.

W celu określenia optymalnego stosunku C : N użyto jako podłoża melasu po wyrobie laktozy. Skład chemiczny serwatki oraz użytych próbek melasu podaje tabela II. Tabela III podaje plon komórek na podłożach z melasu o różnym stosunku C : N (zawartość suchej masy, laktozy oraz C : N podano w stosunku do suchej masy podłoża).

Na podłożach przygotowanych z melasu po wyrobie laktozy otrzymywano plon znacznie niższy niż na serwatce, co może być spowodowane denaturacją w czasie jej zagęszczenia.

Obniżanie stosunku C : N w podłożu, przez zmniejszenie ilości dodawanej laktozy, powodowało nieznaczny wzrost plonu komórek lub nie wywierało wpływu. Najniższy stosunek węgla do azotu, jaki uzyskano

Tabela II

Skład chemiczny serwatki i melasu
Chemical characteristics of whey and molasses

Składniki — Ingredients	Serwatka Whey	Melas 1 Molasses 1	Melas 2 Molasses 2
Woda % — Water	93,76	80,14	83,39
Sucha masa % — Dry matter	6,24	19,86	16,61
Laktoza % — Lactose	5,28	11,99	8,15
Substancje białkowe % — Proteine	0,40	2,95	2,44
Popiół % — Ash	0,45	4,46	5,27
	1,023	1,087	1,075
w suchej masie — in dry matter			
Laktoza % — Lactose	84,61	60,37	49,05
Substancje białkowe % — Proteine	6,41	14,85	14,67
C : N	35,60	11,00	8,96
Popiół % — Ash	7,21	22,46	31,69

Tabela III

Zależność plonu komórek *S. lactis* od stosunku węgla do azotu
Effect of the relative contents of C and Non yield of *S. lactis*

Podłoże — Medium	C : N	Plon komórek w skali nefelometru Yield of cells (nephelometric scale)		
		S. lactis	*S. cremoris*	*A*
Serwatka — Whey	35	86	102	118
Melas 1 — Molasses 1	35	19	—	4
(rozcieńczenie 7,8)	11	28	6	8
	35	24	32	20
	26	24	34	18
Melas 2 — Molasses 2	20	27	32	18
(rozcieńczenie 6,4)	13	26	34	22
	10	32	34	21
	9	30	36	28
	31	48	50	66
Melas 2 — Molasses 2	23	48	52	68
+ 2% autolizatu drożdży	17	46	52	66
+ 2% of yeast autolysate	11	52	48	70
	9	53	56	68
	8	56	60	66

przy użyciu melasu, wynosi 8. Na podłożu tym we wszystkich prawie wypadkach osiągano plon trochę wyższy niż na podłożu wyjściowym o stosunku C : N 35 (takim jak w serwatce). Ze względu na słaby rozwój szczepów oraz dość dużą zawartość laktozy w melasach, uniemożliwiającą dalsze obniżanie C : N, trudno na podstawie uzyskanych wyników ustalić optymalny stosunek węgla do azotu. Wyniki te zdają się wskazywać na niekorzystny stosunek C : N w serwatce. Prawie czterokrotne obniżenie tego stosunku nie obniżyło plonu, a przeciwnie, obserwowano nawet niewielką zwyżkę. Prowadzenie dalszych prób ustalenia optymalnego stosunku węgla do azotu wydaje się uzasadnione.

Dodatek związków kompleksowych. Dodatek związków tych do serwatki pozwolił znacznie podnieść plon komórek badanych szczepów. Tabela IV przedstawia podwyższenie plonu w procentach, przy zastosowaniu optymalnych dawek poszczególnych preparatów.

Z przebadanych preparatów najbardziej stymulująco działały autolizaty drożdży, przy czym autolizaty drożdży piwnych dały plon wyższy niż drożdże piekarniane. Przy dodatku autolizatu drożdży piwnych odgoryczonych uzyskano u wszystkich szczepów nieznacznie wyższe plony niż przy dodatku autolizatu drożdży nieodgoryczonych. Dużą zwyżkę plonu u wszystkich szczepów (ponad 50%) uzyskano również przy dodatku wyciągu z autolizowanych nasion fasoli. Dodatek wyciągu fasoli razem z autolizatem drożdży okazał się najbardziej efektywny, pozwolił bowiem zwiększyć plon komórek badanych szczepów o 87-112%. Dodatek wyciągu ze szpinaku znacznie podwyższył plon *S. lactis*.

Wydaje się, że korzystny wpływ autolizatów z drożdży lub z fasoli należałoby tłumaczyć nie tylko zawartością witaminów kompleksu *B*, lecz również formą azotu. Korzystny wpływ dodatku wyciągu z liści szpinaku na plon *S. lactis* można by między innymi tłumaczyć zawartością kwasu foliowego, który ma pobudzać rozwój szczepów tego gatunku.

WIĄZANIE KWASU MLEKOWEGO WĘGLANEM WAPNIA

Dodatek węglanu wapnia pozwolił podnieść znacznie plon komórek badanych szczepów: u *S. lactis* zwyżka plonu wynosiła 84%, u *S. cremoris* 49%, u szczepu *A* 55%. Maksymalny plon uzyskano przy dodatku 1-1,5% $CaCO_3$, dalsze zwiększenie dawki (do 2,7%) praktycznie nie zmieniało już plonu. Przy stopniowym dodatku węglanu wapnia w miarę powstawania kwasu mlekowego uzyskano plon niższy niż przy dodatku jednorazowym.

Wielu autorów zwraca uwagę na to, że wiązanie kwasu mlekowego w czasie hodowli bakterii mlekowych wpływa nie tylko na gromadzenie

Tabela IV

Wpływ dodatku związków kompleksowych na plon komórek

Effect of enrichment of medium on the yield of cells

Rodzaj dodawanego związku kompleksowego Enrichment	Dodatek ml/100 ml serwatki ml per 100 ml of whey	*S. lactis*		*S. cremoris*		*A*	
		plon yield	podwyższenie plonu w % increase per cent	plon yield	podwyższenie plonu w % increase per cent	plon yield	podwyższenie plonu w % increase per cent
Autolizat drożdży piekarnianych Baker-yeast autolysate	2,0	160	63	162	53	190	72
Autolizat drożdży piwnych nieodgoryczonych Beer yeast autolysate bitter	2,0	168	71	169	59	198	80
Autolizat drożdży piwnych odgoryczonych Beer yeast autolysate, unbittered	2,0	184	88	176	66	212	93
Ekstrakt drożdży piekarnianych Baker yeast extract	7,5	152	55	148	40	186	69
Autolizat ziarn kefirowych Kephir-granula autolysate	7,5	148	51	122	15	146	33
Ekstrakt z ziarn kefirowych Kephir-granula extract	7,5	128	31	124	17	140	27
Wyciąg z kiełków słodowych Malt extract	5,0	136	39	—	—	130	18
Wyciąg z nasion fasoli Bean extract	5,0	172	75	168	58	182	65
Wyciąg z liści szpinaku Spinage leaves extract	10,0	180	84	126	19	154	40
Autolizat drożdży + wyciąg ze szpinaku Yeast autolysate + spinage extract	2,0 10,0	198	102	158	49	302	84
Autolizat drożdży + wyciąg z fasoli Yeast autolysate + bean extract	2,0 2,0	202	112	198	87	216	96
Kontrola (serwatka) Control (whey)		98		106		110	

mleczanów w kulturze, lecz również i na zwiększenie ilości komórek (Hammer i Babel, 1943, Hammer, 1948, Matuszewski 1947). Potwierdzają to uzyskane wyniki.

WPŁYW PRZEWIETRZANIA, DWUTLENKU WĘGLA I RUCHU MECHANICZNEGO ŚRODOWISKA

Zarówno przewietrzanie jak i przedmuchiwanie CO_2 wywołują jednoczesne mieszanie hodowli. Dlatego też wpływ tych czynników badano jednocześnie, z zachowaniem możliwie jednakowych warunków. Hodowlę prowadzono do chwili uzyskania maksymalnego plonu. Wyniki doświadczenia podaje tabela V.

Przewietrzanie środowiska w czasie hodowli nie przyniosło oczekiwanego podwyższenia plonu komórek; u *S. cremoris* i szczepu *A* obserwuje się niewielkie, nieprzekraczające 27%, zwiększenie ilości komórek, a u *S. lactis* zmniejszenie plonu o 20% w porównaniu z próbą kontrolną.

Przy hodowli w atmosferze CO_2 uzyskano we wszystkich wypadkach większy plon komórek niż w próbie kontrolnej: u *S. lactis* o 10%, u *S. cremoris* o 23%, a u szczepu *A* o 58%.

Ruch mechaniczny środowiska (zastosowanie mieszadła) przy ograniczonym dostępie powietrza wybitnie podwyższył plon komórek: *S. lactis* o 167%, *S. cremoris* o 162%, a szczepu *A* o 180%.

Tabela V

Wpływ przewietrzania, CO_2 i ruchu mechanicznego na plon komórek
Effect of aeration, CO_2 and shaking on yield of cells

Szczepy Strains	Plon komórek w skali nefelometru Yield - nephelometric scale			
	przewietrzanie aerated	CO_2	ruch mechaniczny shaking	kontrola control
S. lactis	73	102	246	92
S. cremoris	99	106	228	86
A	111	139	258	88

Wyniki doświadczeń z przewietrzaniem i CO_2 nie są wystarczające dla wyciągnięcia wniosków o wpływie tych czynników na nagromadzenie masy komórkowej badanych szczepów. Jednak wyraźna różnica w plonie w stosunku do próby, w której zastosowano ruch mechaniczny, skłoniła do przerwania doświadczeń z przewietrzaniem i CO_2. Ruch środowiska, jako czynnik wyraźnie podwyższający plon komórek, zastosowano w ostatniej próbie uzyskania maksymalnego plonu.

PRÓBY OTRZYMANIA MAKSYMALNEGO PLONU KOMÓREK

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pozwoliły na ustalenie czynników wpływających na zwiększenie plonu komórek badanych szczepów. Z przebadanych czynników decydującymi okazały się następujące: 1) sposób wyjaławiania podłoża, 2) początkowe *pH* podłoża, 3) dodatek związków kompleksowych (zawierających czynniki wzrostowe), 4) wiązanie kwasu mlekowego, 5) ruch mechaniczny środowiska.

Tabela VI

Wpływ warunków hodowli na plon komórek badanych szczepów
Effect of culture conditions on the yield of cells

Zastosowane czynniki Conditions of incubation	Plon komórek — Yield					
	S. lactis		*S. cremoris*		*A*	
	w skali nefelom. nephelometric scale	ilość komórek w 1 ml miliardach cell count per 1 ml 10^9	w skali nefelom. nephelometric scale	ilość komórek w 1 ml miliardach cell count per 1 ml 10^9	w skali nefelom. nephelometric scale	ilość komórek w 1 ml miliardach cell count per 1 ml 10^9
1. Serwatka sterylizowana, *pH* 5,4 Whey sterilised	22	1,7	28	2,2	30	2,4
2. Serwetka pasteryzowana Whey pasteurised *pH* 6,8	116	9,2	126	9,9	112	8,8
3. + $CaCO_3$	168	13,3	152	12,6	152	12,0
4. + Związki kompleksowe + Enrichment	198	15,6	176	13,9	212	16,7
5. + Ruch środowiska + Shaking	246	19,4	228	18,0	258	20,4
6. Wszystkie czynniki 2 + 3 + 4 + 5 All factors together (2 + 3 + 4 + 5)	342	27,0	316	24,9	362	28,5

Czynniki te zostały zastosowane w ostatnich próbach maksymalnego nagromadzenia komórek. Próby te przeprowadzono w sposób następu-

jący: do serwatki dodawano 2% autolizatu drożdży piwnych i 2% wyciągu z autolizowanych nasion fasoli, a dla *S. lactis* dodatkowo 5% wyciągu z liści szpinaku. Następnie dodawano sterylizowaną kredę w ilości 25 g/l. Tak przygotowane podłoże szczepiono 6-8-godzinną kulturą macierzystą w ilości 75 ml/l. Rozmnażanie prowadzono przez 60-72 godzin w 25°, stosując stałe mieszanie środowiska przy ograniczonym dostępie powietrza.

Uzyskany plon komórek *S. lactis* wynosił 26,2-27 miliardów, *S. cremoris* 24,9 miliardów, a szczepu *A* 28,6 miliardów komórek w 1 ml.

Tabela VI podaje plon komórek uzyskany przy kolejnym zastosowaniu ważniejszych czynników i ostateczne nagromadzenie masy komórkowej badanych szczepów, wyrażone w skali nefelometru i w ilości komórek w 1 ml kultury.

Zastosowany sposób rozmnażania kultur pozwolił podwyższyć plon komórek badanych szczepów 11-15-krotnie. W porównaniu z ilością komórek w kulturze hodowanej na mleku, plon komórek podwyższono 25-28 razy.

WYDAJNOŚĆ OTRZYMANEJ MASY KOMÓRKOWEJ

Po nagromadzeniu komórek oznaczono wagowo oddzieloną przez wirowanie masę komórkową. W celu ustalenia wydajności oznaczono w serwatce wyjściowej, masie bakteryjnej i serwatce „resztkowej" zawartość suchej substancji i azotu ogólnego; poza tym określono stopień wykorzystania laktozy. Uzyskane wyniki podano w tabelach VII i VIII.

Tabela VII

Wydajność biomasy *S. lactis* z 1 l serwatki
Yield of *S. lactis* per 1 l of whey

	Doświadczenie 1 Experiment 1	Doświadczenie 2 Experiment 2
Plon komórek (ilość komórek w 1 ml — 10^9) Cell count per 1 ml — 10^9	26,50	27,00
Uzyskana surowa masa komórkowa w g Weight of cells in g	4,68	5,16
Zawartość suchej masy w komórkach w % Dry matter in cells, per cent	19,55	20,08
Zawartość azotu w suchej masie komórkowej Nitrogen content in dry matter, per cent	10,91	10,80

Tabela VIII

Wykorzystanie suchej masy, azotu i laktozy w serwatce
Yield of cells in relation to dry matter, nitrogen and lactose content in whey

		W 1 l serwatki—Per 1 l of whey			
		Serwatka - whey		masa komórkowa cells	% wykorzystania per cent utilised
		wyjściowa before incubation	resztkowa after incubation		
Sucha masa Dry matter	g	60,50	56,20	1,03	1,7
Azot ogólny N total	g	0,724	0,544	0,113	15,6
Laktoza Lactose	g	42,13	1,53	—	96,4

Otrzymana masa bakteryjna miała barwę szarą i strukturę zbliżoną do masy komórkowej drożdży. Pod mikroskopem (w preparacie bezpośrednim) nie dostrzeżono zmian morfologicznych, zakażenia ani zanieczyszczeń.

Ilość masy komórkowej była niższa od spodziewanej. Według teoretycznych obliczeń — po uwzględnieniu ilości i rozmiarów komórek — plon paciorkowców w 1 l podłoża powinien wynosić 7,24 g surowej masy bakteryjnej. Otrzymano 5,16 g, co stanowi 71% obliczonej teoretycznie ilości. Dopuszczając 15% błędu w obliczeniu ilości komórek, pozostałą różnicę (14%) należałoby tłumaczyć stratami przy oddzielaniu masy bakteryjnej. Prawdopodobnie również dlatego w przeprowadzonym bilansie nie została ujęta część suchej masy.

Podsumowując można stwierdzić, że:

1. Z jednego litra serwatki otrzymano 5,16 g suchej masy bakteryjnej, co stanowi 0,5% podłoża,
2. Sucha masa serwatki została wykorzystana na produkcję biomasy w 1,7 procentach,
3. Wykorzystanie azotu wynosi 15,6%.

Prawie zupełne wyczerpanie laktozy (96,4%) tłumaczyć należy warunkami korzystnymi dla fermentacji mlekowej w czasie rozmnażania.

W porównaniu z wydajnością biomasy drożdży czy pleśni produkowanych na skalę techniczną, osiągnięty stopień wykorzystania składników podłoża jest jeszcze bardzo niski, natomiast w porównaniu ze zwykłą kulturą na mleku czy serwatce plon jest wyraźnie większy. Tak więc wykorzystanie suchej masy podłoża w zwykłej kulturze na mleku wynosi 0,06% (wydajność obliczono teoretycznie, przyjmując miliard ko-

mórek w 1 ml i 12,2% suchej masy w mleku), na serwatce — 0,1%. Przy produkcji masy komórkowej *Torula utilis* wykorzystanie suchej masy serwatki na produkcję suchej substancji komórek wynosi 27% (Siman, 1950), jest zatem 16 razy wyższe niż w przypadku paciorkowca mlekowego. Wyniki pracy zdają się jednakże wskazywać na możliwość dalszego zwiększenia plonu komórek paciorkowców mlekowych, co pozwoli na zwiększenie wykorzystania składników podłoża.

WNIOSKI OGÓLNE

1. Opracowany sposób namnażania komórek paciorkowców mlekowych jest bardzo zbliżony do sposobu produkcji kwasu mlekowego.

2. Otrzymana wydajność biomasy paciorkowców mlekowych w porównaniu z wydajnością drożdży czy pleśni jest niska, niemniej jednak przewyższa 30-krotnie wydajność zwykłych kultur na mleku.

3. Otrzymane wyniki wskazują na możliwości zwiększenia wydajności drogą dalszych prób.

4. Wydaje się, że dla zwiększenia plonu należałoby w pierwszym rzędzie przeprowadzić badania nad źródłami azotu, stosunkiem węgla do azotu oraz wpływem czynników wzrostowych, a ponadto nad zagadnieniem denaturacji podłoża oraz sposobem mieszania środowiska w czasie rozmnażania (przede wszystkim prędkość mieszadła). Należałoby również zwrócić uwagę na wpływ soli mineralnych i mikroelementów, co nie zostało uwzględnione w obecnej pracy.

5. Próby technicznego rozwiązania produkcji masy komórkowej paciorkowców mlekowych mogą być podjęte dopiero po co najmniej trzykrotnym zwiększeniu wydajności i po przeprowadzeniu badań nad aktywnością i trwałością otrzymanej masy bakteryjnej.

6. Wydaje się, że przy opracowaniu metody otrzymywania biomasy paciorkowców mlekowych należałoby uwzględnić jednoczesną produkcję kwasu mlekowego.

Za udzieloną mi pomoc i wskazówki mam zaszczyt podziękować Panu doc. Mgrowi Romanowi Majchrzakowi, Panu Profesorowi Drowi Eugeniuszowi Pijanowskiemu i Pani Prof. Mgr Halinie Karnickiej. Jednocześnie składam podziękowanie Panu Mgrowi L. Kalinowskiemu, Kierownikowi Zakładu Mikrobiologii Instytutu Przemysłu Mleczarskiego, za wielokrotnie okazywaną mi pomoc w kompletowaniu aparatury i zbieraniu potrzebnych materiałów.

LITERATURA

Anderson A. W., Elliker P. R., 1953: The nutritional requirements of lactic streptococci isolated from starter cultures. *J. Dairy Sci.*, **36** : 161, 168.

Ber A., 1950: Hormony wzrostu roślin zielonych, grzybów i bakterii. Warszawa.

Buhrgard A. B., 1954: A propos de l'entretien des cultures à la laiterie. *Swenska Mejeritidningen*, według *Lait* 1956. **36** : 528.

Bogdanow W., 1949: Mikrobiologija mołoka i mołocznych produktow. Moskwa.

Bogdanow W., 1953: Usilenije aromatu zakwaski dla masła. *Moł. Prom.* nr 8.

Dagley E. A., Morrison G. A., Dawes E. A., 1951: The effect of aeration on the growth of *Aerobacter aerogenes* and *Escherichia coli*, with reference to the Pasteur mechanism. *J. Bact.*, **61** : 433.

Diethelm A., 1932: Studium über die Bakterienflora des normal reifenden Tilsiter Kaesen. Praca dysertacyjna, Kiel.

Dorner W., Demond P., Chavannes D., 1942: Microbiologie laitière. II wyd. Lausanne.

Fabel K., 1949: Die Anwendung des Biosyn.-Verfahrens auf Molke. *Milchwiss.*, **4** : 203.

Hammer B. W., 1948: Dairy Bacteriology. London.

Hammer B. W., Babel F. J., 1943: Revue de la littérature consacrée à bacteriologie des cultures pour beurre. *J. Dairy Sci.*, **26** : 23. Wg *Lait*, 1949, **29** : 609.

Jago G. R., 1954: *Dairy Res.*, **21** : 111.

Jerusalimski N. D., 1949: Azotnoje i witaminnoje pitanije mikrobow. Moskwa-Leningrad.

Kennedy H. E., Speck M. L. i Aurand, 1954: Studies on corn steep liquor in the nutrition of certain lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **37** : 605.

Longsworth L. G., Mac Innes D. A., 1935: Bacterial growth with automatic *pH* control. *J. Bact.*, **29** : 602.

Majchrzak R., 1947: Metoda bezpośrednia liczenia bakterii. Zakł. Mikrob. Techn. S.G.G.W. Warszawa. Praca nie publikowana.

Majchrzak R., 1932: Technika fermentacji mlekowej melasu. Praca dyplomowa. Katedra Przem. Rolno-Fermentacyjnego S.G.G.W., Warszawa.

Mattick A. T. R., Hirsch A., 1947: *Lancet*, 253.

Matuszewski T., 1947: Wstęp do mikrobiologii rolniczej. Puławy.

Möller E. F., 1950: Die Bedeutung der Wuchstoffe im Stoffwechsel der Milchsaürebakterien. *Milchwiss*, **5** : 313.

Oberman H., 1955: Zapotrzebowanie pokarmowe pięciu szczepów bakterii fermentacji mlekowej. *Acta Microbiol. Polon.*, **4** : 281.

Pappenheimer A. M., Hottle G. A., 1940: Effect of certain purines and CO_2 on growth of strain of group A haemolytic streptococcus. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **40** : 645.

Pette J. W., Kooy J. S., 1953: The inhibition of butyric acid fermentation in cheese by antibiotic producing starter. *XII Int. Dairy Congress*, **111** : 1172.

Pijanowski E., 1946: Wartość odżywcza i techniczna odpadków w mleczarni. Dodatek do Poradn. Mlecz. i Jajcz.

Reifer I., Tarnowska, 1950: *Acta Soc. Botan. Polon.*, : 20.

Ritter W., 1953: Ernährung der Milchsaürebakterien. Istituto Superiore di Sanita. Roma; wg *Milchwiss.* **1954, 9** : 98.

Ritter W., 1954: Ergebnisse neuerer Forschungen über die Ernährung der Milchsäurebakterien. *Mitt. Lebensmitt. u. Hygiene. Eidg. Gesundheitsamt in Bern.*, : 45

Schultz M., 1946: Beitrag zur Kenntnis der Kefirpilz-Symbiose. *Milchwiss.* **1** : 1.

Siman J., 1950: Zužitkovani syrovatky. Praha.

Snell E. E., 1950: Vitamin methods, t. I.

Stelling-Dekker N. M., 1931: Die Sporogenes Hefen. Amsterdam.

Stephenson M., 1949: Bacterial Metabolism. Tłum. ros. Moskwa, 1951.
Szapasznikow W., Manteuffel A., 1923: Trudy chimfarm. instituta. 7; cyt. Szapasznikow W., Techniczeskaja Mikrobiołogija., Tłum. pol. Warszawa. 1951.

B. Czarnocka-Roczniakowa

STUDIES ON BIOMASS PRODUCTION OF LACTIC STREPTOCOCCI ON WHEY

Summary

The aim of present research was finding of optimal conditions for maximal yield of *S. lactis* cells cultured on whey.

The maximal yield was obtained on whey from which albumine and globuline was precipitated with acetic acid. *pH* adjusted to 6,8. Whey was pasteurised at 96° C for 20 minutes. Whey-medium was enriched with organic extracts (yeast, bean, leaves etc.) and calcium carbonate was added to neutralise the lactic acid formed during growth. For inoculum cells from culture in logarithmic phase of growth were used. Streptococci were cultured in microaerophilic conditions in shake-cultures at 25° C for 60-72 hours.

Maximal yields of *S. lactis*, *S. cremoris* and of acetoinproducing strain *A* were: $2,7 \cdot 10^{10}$, $2,49 \cdot 10^{10}$ and $2,85 \cdot 10^{10}$ cells per 1 ml of culture medium, respectively.

The yield was then 25 - 28 times higher than on skimmilk.

Yield of $2,7 \cdot 10^{10}$ cells per 1 ml was equivalent to 5,16 g of biomass per 1000 ml of culture-medium. Content of dry mass was 20,08% and of total nitrogen — 10,91% of dry mass.

For production of bacterial mass 1.7% of dry mass and 15% of nitrogen content of medium were utilized.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 403—419

BIBLIOGRAFIA POLSKICH PRAC Z DZIEDZINY MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNEJ I TECHNICZNEJ ZA I PÓŁROCZE 1957 r.

Opracowali: *T. Hauke-Pacewiczowa, J. Januszewicz, Z. Wieczorek* pod redakcją *W. Kunickiego-Goldfingera.*

Zgodnie z życzeniem Głównego Zarządu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów i zaleceniem Rady Redakcyjnej Acta Microbiologica Polonica, Redakcja rozpoczęła publikować bibliografię polskich prac z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej.

Zestawienia będą publikowane co pół roku i będą obejmowały tytuły prac, ułożone alfabetycznie według nazwisk autorów.

Po alfabetycznym spisie zamieszczony jest podział tematyczny cytowanych prac.

Redakcja zdaje sobie sprawę, że przedkładane czytelnikom zestawienie zawiera jeszcze wiele luk i przeoczeń. Wdzięczna dlatego będzie czytelnikom za nadesłanie uwag i uzupełnień.

BIBLIOGRAPHY OF POLISH PAPERS ON GENERAL, AGRICULTURAL AND TECHNICAL MICROBIOLOGY COVERING PERIOD 1 JANUARY — 30 JUNE 1957.

It is aim of bibliography to give readers the complete list of scientifical papers on general, agricultural and technical microbiology published by Polish research-workers.

It will be published in Nos 1 and 4 of our quarterly journal, so that period covered by compilation will begin with January or July and end with June or December of each year.

The text consists of titles of papers grouped in an alphabetic order according to authors' names. Following the text is an index, arranged by headings of microbiology (Cytology, Physiology, Genetics, Antybiosis, Viruses, Microbiology of soil and plants, Microbiology of water, Microbiology of food, Industrial Microbiology, Phytopathology, Laboratory techniques and methods).

The list in the future will contain English and Polish titles.

SKRÓTY — ABBREVIATIONS

Przegl.	—	Praca przeglądowa, Referative paper
Oryg.	—	Praca oryginalna, Research paper
A	—	Cytologia, budowa chemiczna i antygenowa Cytology, chemical and antigenic structure
B	—	Fizjologia — Metabolizm Physiology — Metabolism
C	—	Genetyka i zmienność Genetics and variability
D	—	Antybioza, antybiotyki i środki antybakteryjne Antibiosis, antibiotics and bactericidal substances
E	—	Wirusy i bakteriofagi Viruses and bacteriophages
F	—	Mikrobiologia gleby i roślin Microbiology of soil and plants
G	—	Mikrobiologia wody i ścieków Microbiology of water and sewage
H	—	Mikrobiologia środków spożywczych i pasz Microbiology of food
I	—	Mikrobiologia przemysłowa (prócz przemysłu fermentacyjnego) Industrial Microbiology (excluding fermentations)
K	—	Przemysł fermentacyjny Fermentation industry
L	—	Fitopatologia Phytopathology
M	—	Metody pracy laboratoryjnej Laboratory techniques and methods

I. ALFABETYCZNY WYKAZ PRAC — ALPHABETICAL INDEX

1. A. R. (Reinhercs A.): Liofilizacja jako metoda przechowywania drobnoustrojów, pozwalająca na zachowanie ich cech biochemicznych. *Przem. Spoż.*, 1957. 3 : 120-121. J. polski. Przegl. I. M.
2. A. R. (Reinhercs A.): Wyosobnienie i charakterystyka nowej kultury drożdży melasowych. *Przem. Spoż.*, 1957. 5 : 208-210. J. Polski. Przegl. I.

Albrycht — patrz Meisel poz. 104, 107.

3. Bagdach J.: Perspektywy zastosowania antybiotyków w przemyśle rybnym. *Gospodarka rybna*, 1957. 3 : 24-25. J. polski. Przegl. H.
4. Bagdasarian G.: Metoda badania metabolizmu ogólnego drobnoustrojów. *Acta Microbiol. Polon.* 1956. 5 : 102. J. polski. Oryg. B. M.
5. Bagdasarian i współpracownicy: Badania podłoży bakteryjnych i standaryzacja zawiesin za pomocą metody oksytropii. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 102. J. polski. Oryg. M.
6. Bagdasarian G. i współpracownicy: Badania nad współczynnikiem ekonomicznym i szybkością zużycia substratów przez drobnoustroje metodą oksytropii. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 103. J. polski. Oryg. B. M.
7. Bagdasarian G. i A. Odrzywolska: Zastosowanie metody badania

oksytropii substratów bakteryjnych dla obserwacji wpływu antybiotyków. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 103. J. polski. Oryg. D. M.

8. Bagdasarian G. i współpracownicy: Badania nad przemianą materii maczugowców błonicy. Doniesienie. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 104. J. polski. Oryg. B.
9. Balicka N. i Sobieszczański J.: Żywotność *Escherichia coli* w glebie nawadnianej ściekami miejskimi. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 207. J. polski. Oryg. F.
10. Balicka N. i Trzebiński M.: Aktywność enzymatyczna i obecność witaminu B_2 w glebie, 1956. *Acta Microbiol. Polon.*, 5 : 377-384. J. polski. Oryg. F.
11. Baranowska L. i Shugar D.: Rola białek w metodyce i w lokalizacji barwienia Gramem drobnoustrojów. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 100. J. polski. Oryg. A.
    Baranowska J. — patrz Shugar D., poz. 147.
12. Bekierkunst A.: Wpływ stężenia jonów wodorowych na wzrost prątków gruźlicy. *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, 1957. 9 : 107. J. polski. Oryg. B.
13. Bekierkunst A. i współpracownicy: Badania nad potrzebami pokarmowymi prątków gruźlicy. Doniesienie II. Wpływ glicerolu na rozmnażanie się prątków gruźlicy na pożywkach stałych. *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, 1957. 9 : 261 J. polski. Oryg. B.
14. Ber A. i Dryżek L.: O czynnikach wzrostowych dla *Saccharomyces cerevisiae* wytwarzanych przez *Penicillium*. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 99. J. polski. Oryg. B.
15. Ber A. i Zieleniewski J.: Wpływ antybiotyków na regenerację. I. Wpływ penicyliny białej krystalicznej i dwuhydrostreptomycyny na regenerację kończyn u żab *Xenopus laevis* Daudin. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956, 5 : 99. J. polski. Oryg. D.
16. Ber A. i Zieleniewski J.: Wpływ penicyliny żółtej i białej, dwuhydrostreptomycyny i wyciągów wodnych z suszu grzybni pofermentacyjnej *Penicillium chrysogenum Q-176* na wzrost i rozwój kijanek *Xenopus laevis* Daudin. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 100. J. polski. Oryg. D.
17. Bogdański K. A.: Błąd stały w analizie kwasu askorbinowego metodą mikrobiologicznej redukcji. *Roczn. P. Z. H.*, 1957. 8 : 1-18. J. polski. Oryg. H. M.
18. Bogdański K. i Ziołecki A.: Własności pektolityczne niektórych szczepów pleśni w zastosowaniu do klarowania moszczów. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 411-416. J. polski. Oryg. K.
19. Borowiecka B.: Oznaczenie streptomycyny w brzeczkach fermentacyjnych za pomocą destylacji maltolu. *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, 1957 9 : 23-34. J. polski. Oryg. D.
20. Borowski J. i Niemiro A.: Badania nad opornością szczepów z rodzaju *Streptococcus* i *Diplococcus* na sulfamidy i 5 antybiotyków. *Biul. Inst. Med. Morskiej* (Gdańsk), 1957. 8 : 117. J. polski. Oryg. D.
21. Brenejzen B.: Stan zagrożenia lasów państwowych przez ważniejsze choroby grzybowe w 1957 r. *Sylwan, 1957*. C. I. 24 : 89-92. J. polski. Przegl. L
22. Buczowska E.: Zależność wzrostu *Escherichia coli* na selektywnym podłożu od środowiska wodnego. *Biul. Inst. Med. Morskiej* (Gdańsk), 1957. 8 : 125-199. J. angielski. Oryg. G.
23. Buczowski Z. i Dąbrowska J.: Higieniczna ocena wodociągów okrętowych. *Roczn. P. Z. H.*, 1957. 8 : 207-212. J. polski. Oryg. G.

24. Bujak St. i Kasprzycka A.: Mikroflora drożdżowa kiszonek ziemniaczanych. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 401-410. J. polski. Oryg. H, K.
25. Burbianka M.: Własności antygenowe „enterotoksyny" — czynnika toksycznego występującego w hodowlach gronkowców. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 245-251. J. polski. Oryg. H.
26. Cabejszek I. i współpracownicy: Wytyczne do oceny stopnia zanieczyszczenia wód rzecznych. *Gaz, Woda i Techn. Sanit.*, 1957. 4 : 144-148. J. polski. Przegl. G.
27. Cabejszek I. i współpracownicy: Charakterystyka higieniczno-sanitarna rzeki Wisły na odcinku Warszawa—Płock. *Gaz, Woda i Techn. Sanit.*, 1957. 5 : 165-172. J. polski. Oryg. G.
28. Czerwińska E. i Kowalik R.: Penicillia niszczące papier zabytkowy. *Acta Microbil. Polon.*, 1956. 5 : 299-302. J. polski. Oryg. I.
Cechowicz — patrz Parnas, poz. 128.
Chodkowski — patrz Parnas, poz. 127.
Czarnowska — patrz Bekierkunst, poz. 13.
Czerniakowski — patrz Zabłocki, poz. 178.
Czerwińska — patrz Kowalik R., poz. 79.
29. Dłużewski M.: Charakterystyka drożdży wywołujących fermentację syropów owocowych i stężonego soku gronowego. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 241-244. J. polski. Oryg. H.
30. Dobrzański B. i Gawlik J.: Z badań nad zależnością niektórych drobnoustrojów glebowych od rzeźby terenu. *Wyd. P. T. G.* Poznań, 1957. 49 : 50. J. polski. Oryg. F.
31. Drabikowski W.: Nowoodkryte nukleotydy polifosforanowe i ich rola w organizmie. *Post. Bioch.*, 1957. 3 : 47-75. Poz. lit. 146. J. polski. Przegl. B.
32. Drożański W.: Fatal bacterial infection in soil amoebae. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 315-318. J. angielski Oryg. F.
33. Duda J.: Zastosowanie metody głębinowej w hodowli azotobaktera. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 113-116. J. polski. Oryg. F, M.
Dąbrowska — patrz Buczowski, poz. 23.
Dąbrowski — patrz Parnas, poz. 128.
Dobrzański —patrz Paluch, poz. 123.
Dryżek — patrz Ber, poz. 14.
Dygdała — patrz Kunicki-Goldfinger, poz. 86, 87.
34. Fleck L. i Kozak W.: Zmienność antygenowa maczugowców błonicy pod wpływem fagów. *Post. Hig. i Med. Dośw.*, 1957. 11 : 179. J. polski. Oryg. C, E.
35. Frydman I.: Mykotrofizm roślinności pokrywającej gruzy i ruiny domów Wrocławia. *Acta Soc. Botan. Polon.*, 1957. 26 : 45-60. J. polski. Oryg. F, L.
Fertig — patrz Utzig, poz. 172.
Filipowicz — patrz Paluch, poz. 121, 124.
36. Gabriel W.: Zagadnienie degeneracji ziemniaka. *Post. Nauk Roln.*, 4 : 101-111. J. polski. Przegl. E, L.
37. Gaugusch Z.: Badania nad konserwowaniem krwi dla celów pastewnych. *Przem. Spoż.*, 1957. 6 : 253-255. J. polski. Oryg. H.
38. Gąsior E.: Transaminaza asparaginowo-glutaminowa u *Mycobacterium phlei*. *Ann. Univers. M. Curie-Skłodowska*, 1956. 9 : 161. J. polski. Oryg. B.
Gąsior — patrz Sakławska-Szymonowa, poz. 145.
39. Golenia A.: Obserwacje nad występowaniem szarej pleśni *Botrytis cinerea*

(Pers.) na plantacjach rącznika w Wielkopolsce. *Acta Agrobot.*, 1956, 5 : 19-32. J. polski. Oryg. L.

40. Gołębiowska J.: Zastosowanie metody Lochheada do badania rozprzestrzenienia w glebie drobnoustrojów czynnych przy przemianach fosforu. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 6 : 17-27. J. polski. Oryg. F..
41. Gołębiowska J. i współpracownicy: L'influence du mode de prélèvement et de conservation des échantillons du sol sur son état microbiologique. Komunikat w sprawozdaniach z „Symposium sur les méthodes d'études microbiologiques du sol", zorganizowanym przez M. Tow. Glebozn., 1957 r. w Louvain (Belgia). J. franc. oryg. F, M.
42. Gołębiowska J. i Myśkow W.: Drobnoustroje udostępniające fosfor roślinom. „Wybrane zagadnienia z mikrobiologii gleby". Zbiór prac pod red. J. Gołębiowskiej. Państw. Wyd. Roln. i Leśn., 1957. 92 : 112. J. polski. Przegl. F.
43. Gołębiowska J.: Wybrane zagadnienia z mikrobiologii gleby. Państw. Wyd. Roln. i Leśn., 1957. J. polski. Przegl. F.
44. Gołębiowska J.: A method of investigation of the microbial population playing a part in the transformation of phosphorus compounds in the soil. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 125-128. J. angielski. Oryg. F, M.
45. Gołębiowska J. i Wróbel T.: Distribution of antagonistic actinomycetes in different soils. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 137-140. J. angielski. Oryg. D, F.

Gołębiowska — patrz Nowotny-Mieczyńska, poz. 118.

Gołębiowska — patrz Wróbel, poz. 177.

46. Górzyńska J.: Poszukiwanie nowych ras drożdży na drodze hybrydyzacji. *Przem. Spoż.*, 1957. 11 : 216. J. polski. Przegl. C. K.
47. Grunland I. i Krzywicka H.: Współzależność między budową a działaniem środków odkażających, a w szczególności substancji powierzchniowoczynnych. *Prace Inst. i Labor. Badawcz. Przem. Roln. Spoż.*, 1957. 1 : 34-46. J. polski. Oryg. D.

Gańczarczyk — patrz Joszt, poz. 65, 66.

Gawlik — patrz Dobrzański, poz. 30.

Gromska — patrz Moycho, poz. 114.

48. Hauke-Pacewicz i Sakowska-Wróbel D.: Mikroflora pudy v jeskyni Macocha u Brna. Komunikat. *Sbornik S-S. A. Z. V. Rostlinná výroba*, 1957. 11 : 1079-1082. J. czeski. Oryg. F.
49. Heller J. i współpracownicy: Bilans energetyczny wzrostu hodowli *M. tuberculosis H37R. Acta Biochem. Polon.*, 1957. 14 : 33-39. J. polski. Oryg. B.
50. Horoszewicz A. i Horoszewicz J.: Obserwacja nad wpływem penicyliny i innych antybiotyków na postacie *L Proteus mirabilis*. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 9-14. J. polski. Oryg. C, D.
51. Horubała A.: Zastosowanie związków powierzchniowo czynnych do usuwania drobnoustrojów z surowców owocowych i warzywnych. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 263-266. J. polski. Oryg. H.

Hulanicka — patrz Bagdasarian, poz. 8.

52. Iskierko J.: Wolne aminokwasy wytwarzane przez brazylijski szczep BCG Moreau. *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, 1957, 9 : 179. J. polski. Oryg. B.

Iskierko — patrz Krzeczkowska, poz. 83.

53. Jakubczyk T.: Studia nad zastosowaniem próby reduktazowej do warzyw i produktów warzywnych. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 259-262. J. polski. Oryg. H, M.

54. Jakubowska J.: Wyodrębnienie i diagnostyka bakterii czynnych w tworniku octowym. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 306. J. polski Oryg. K.
55. Jakubowska J. i współpracownicy: Mikrobiologiczne badania kazeiny włókienniczej. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 304. J. polski. Oryg. I.
56. Janczura E. i Piasecka-Aleksandrowicz J.: Wykorzystanie siarki i kwasu glutaminowego przez szczep *PW* 8 maczugowca błonicy. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 105. J. polski. Oryg. B.
57. Janicki J. i Pędziwilk F.: Witamin B_{12} i antybiotyki w żywieniu zwierząt. *Post. Bioch.*, 1957. 3 : 91-119. J. polski. Przegl. B., D.
58. Jankun A.: Wyosobnienie i zbadanie szczepu drożdży „Brusznica 7". *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 303. J. polski. Oryg. K.
59. Janota B.: Powiązanie anabolizmu z katabolizmem u *Pseudomonas extorquens* Bassalik. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 104. J. polski. Oryg. B.
60. Janota L.: Further researches on *Pseudomonas extorquens* Bassalik, A Microorganisms utilizing oxalic acid. *Acta Soc. Botan. Polon.*, 1957. 1. : 207-214. J. angielski. Oryg. B.
61. Januszewicz I.: Biosynteza dekstranu przez różne szczepy *Leuconostoc mesenteroides*. *Acta Microbiol. Polon.*, 5 : 217-224. J. polski. Oryg. K.
62. Janowiec M. i współpracownicy: The antibacterial action of some rhodanine derivatives. *Bull. Ac. Polon. Sci.*, 5 : 201-206. J. angielski. Oryg. D.
63. Jarmolińska A. i Shugar D.: Barwienie i działanie różnych enzymów na bakterie termofilne żywe i zabite wysoką temperaturą. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 101. J. polski. Oryg. A.
64. Jarmolińska A. i Shugar D.: Bakterie termofilne. *Przem. Spoż.*, 1957. 1 : 10-18. J. polski. Przegl. B.
65. Joszt A. i Gańczarczyk J.: Odbudowa kwasów ligninosulfonowych w tlenowych warunkach rzeki. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 211-212. J. polski. Oryg. G.
66. Joszt A. i współpracownicy: Odbudowa kwasów ligninosulfonowych metodą osadu czynnego. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 211. J. polski. Oryg. G. Jurkowska — patrz Lityński, poz. 93.
67. Kałużewski S.: Badania nad odczynem fosfatazowym u różnych gatunków drobnoustrojów. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 95-98. J. polski. Oryg. B, M.
68. Karczewska H.: Zastosowanie tzw. „dzikich drożdży" oraz wyprowadzenie czystych kultur metodą ciągłą. *Przem. Ferment.*, 1/2/3 : 97-99. J. polski. Przegl. K.
69. Karska P.: Adaptacja fagów gronkowcowych do szczepów maczugowców błonicy. *Post. Hig. i Med. Dośw.*, 1957. 11 : 95. J. polski. Oryg. C, E.
70. Kluczycki K.: Znaczenie doboru biocenoz swoistych dla oczyszczania ścieków przemysłowych. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 214. J. polski. Oryg. G.
71. Kluczycki K.: Standardowe kultury grzybów drzewnych do badania wartości grzybobójczej i grzybochronnej. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 305. J. polski. Oryg. I.
72. Kocwa E.: Wpływ penicyliny na wytwarzanie acetonu przez *Clostridium acetobutylicum*. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 231-234. J. polski. Oryg. D, K.
73. Korzybski T.: Aktynomycyny, własności i budowa. *Post. Bioch.*, 1957. 3 : 121-154. J. polski. Przegl. D.
74. Kostrzewski J.: Wspomnienie o Romanie Nitschu w związku z jego

zapatrywaniem na przyrodę wirusa ustalonego. *Przegl. Epidemiol.*, 1957 : 195. J. polski. Przegl. E.

75. Kovats J.: Die Bacteriophagen in der Aceton-Butylalkohol-Fermentation. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 225-230. J. niemiecki. Oryg. E, K.
76. Kovats J.: Bakteriofagi fermentacji acetonobutylowej. *Przem. Spoż.*, 1957. 2: 113-118. J. polski. Oryg. E, K.
77. Kowalik R. i Sadurska I.: Mikroflora niszcząca papier, skórę i pieczęcie woskowe, występujące w powietrzu magazynów archiwalnych. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 277-284. J. polski. Oryg. I.
78. Kowalik R. i Sadurska I.: Mikroorganizmy niszczące oprawy książkowe ze skóry. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956, 5 : 285-290. J. polski. Oryg. I.
79. Kowalik R. i Czerwińska E.: Mikroorganizmy niszczące tkaniny bawełniane i wełniane. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 291-298. J. polski. Oryg. I.

Kowalik — patrz Czerwińska, poz. 28.

80. Kozak W.: Lizogenia i adaptacja fagów u maczugowców błonicy. *Post. Hig. i Med. Dośw.*, 1957. 11 : 187. J. polski. Oryg. C, E.

Kozak — patrz Fleck, poz. 34.

81. Koziński A. W.: Badania nad istotą lizogenii i bakteriocynogenii oraz zjawiskami podobnymi. *Post. Hig. i Med. Dośw.*, 1957. 11 : 3. J. polski. Przegl. C, E.
82. Kryński J. i Mokszyszczak H.: Jakość i wartość użytkowa drożdży po okresie gwarancyjnym. *Opakowanie*, 1957. 2 : 21-23. J. polski. Oryg. K.
83. Krzeczkowska I. i Iskierko J.: Skład aminokwasowy BCG szczepu brazylijskiego Moreau. *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, 1957. 9 : 185-191. J. polski. Oryg. A.
84. Książek D.: Choroby wirusowe łubinu w świetle literatury światowej. *Post. Nauk Roln.*, 1957. 3 : 15-29. J. polski. Przegl. E, L.
85. Książek D.: Choroby wirusowe cebuli i jej pokrewnych roślin w świetle literatury światowej. *Post. Nauk Roln.*, 1957. 9 : 87-96. J. polski. Przegl. E, L.
86. Kunicki-Goldfinger Wł. i inni: Wpływ chlorku litu na *Escherichia coli* i niektóre inne bakterie. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 33-40. J. polski. Oryg. C.
87. Kunicki-Goldfinger W. i współpracownicy: Formy gonidialne bakterii. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 41-44. J. polski. Oryg. C.

Kunicki-Goldfinger — patrz Kwiatkowski, poz. 89.

88. Kurzepa H.: *Acetobacter xylinum* jako ilościowy wskaźnik kwasu pantotenowego. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 106. J. polski. Oryg. B, M.
89. Kwiatkowski Z. i współpracownicy: Niektóre własności fizjologiczne pałeczki odmieńca pospolitego w stadium *L. Acta Microbiol. Polon.*, 1956, 5 : 15-20. J. polski. Oryg. C.

Kwiatkowski — patrz Sander, poz. 146.

90. Kwapiński J.: Badania nad budową antygenową maczugowców błonicy. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956, 5 : 321-352. J. polski. Oryg. A.

Kasprzycka — patrz Bujak, poz. 24.

Kleczkowska — patrz Bagdasarian, poz. 8.

Kłopotowicz — patrz Bagdasarian, poz. 8.

Kobus — patrz Gołębiowska, poz. 41.

Koślak — patrz Parnas, poz. 128.

Kozicka — patrz Parnas, poz. 128.

Koziorowski — patrz Cabejszek, poz. 26, 27.
Krawczyk — patrz Skarżyński, poz. 148.
Krzywicka — patrz Grunland, poz. 47.
Kwiek — patrz Tysarowski, poz. 170, 171.

91. Lipińska E.: Mikrobiologiczne metody zapobiegania wadom sera wywoływanym przez bakterie kwasu masłowego. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 271-276. J. polski. Oryg. H, K.
92. Lipnicki B.: Rola form *L* bakterii w chorobie Raitra, *Polskie Arch. Med. Wewn.*, 1957. 3 : 399. J. polski. Przegl. C.
93. Lityński T. i współpracownicy: Wpływ fluoru na kropidlaka (*Aspergillus niger*). *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 147-164. J. polski. Oryg. B.
94. Lorkiewicz Z. i współpracownicy: Wpływ niektórych czynników na powstawanie form *L*. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 27-32. J. polski. Oryg. C.
95. Lorkiewicz Z.: Growth of stabilized *L* forms of *Proteus vulgaris* without the addition of serum and penicillin. *Acta Microbiol. Polon.*, 1957, 6 : 3-8. J. angielski. Oryg. C.

Lorkiewicz — patrz Kwiatkowski, poz. 89.

96. Løvtrup S.: The induced synthesis of enzymes in microorganisms. *Acta Bioch. Polon.*, 1956. 3 : 475-495: J. angielski. Oryg. B.
97. Luchterowa A. i Markiel E.: Wpływ gazu ziemnego na rozwój bakterii metanowych w glebie. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 141-146. J. polski. Oryg. F.

Larski — patrz Szurman, poz. 162.
Linde — patrz Meduski, poz. 102.

98. Łachecka B.: Drożdże *Schizosaccharomyces pombe* jako zakażenia moszczów owocowych siarkowanych. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 304. J. polski. Oryg. H, K.

Łagowska — patrz Kunicki-Goldfinger, poz. 86, 87.
Łazuga — patrz Parnas, poz. 128, 129.
Łyczakowska patrz Bekierkunst, poz. 13.
Łyczewska — patrz Bagdasarian, poz. 5.

99. Macander W.: Badania nad prątkami kwasoopornymi występującymi w wodzie rzecznej, do której wpływają ścieki po przejściu przez oczyszczalnię. *Acta Microbiol. Polon.* 1956. 5 : 201-206. J. polski. Oryg. G.
100. Makower H.: Rozkład i resynteza wirusa mozaiki tytoniowej. *Kosmos*, 1957. 6 : 225-228. J. polski. Przegl. E.
101. Marszewska-Ziemięcka J.: Biologia gleby na VI Międzynarodowym Kongresie Gleboznawczym. *Post. Nauk Roln.*, 1957. 2 : 75-86. J. polski. Przegl. F.
102. Meduski I. i współpracownicy: Badania nad wpływem warunków hodowli na przebieg czynności enzymatycznych u *Escherichia coli*. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 53-56. J. polski. Oryg. B, C.
103. Meduski J. i współpracownicy: Badania nad fosfolipazą *C Clostridium perfringens*. Lecytyna wodorowana jako substrat fosfolipazy *C* w środowisku wodnym. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 77-78. J. polski. Oryg. B.
104. Meisel H. i współpracownicy: Wpływ dwuwartościowego żelaza na wytwarzanie lecytynazy przez szczepy *Cl. perfringens* typu *A* i *Cl. sordelli*. *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, 1957. 9 : 141-154. J. polski. Oryg. B.
105. Meisel H.: Budowa antygenowa beztlenowo rosnących zarodnikowców.

„Budowa antygenowa bakterii chorobotwórczych". *Zesz. Problem. Nauki Polskiej.*, 1957. 10 : 341-383. J. polski. Przegl. A.

106. Meisel H. i Trembowler P.: Analiza własności biochemicznych, serologicznych i toksynotwórczych szczepów *Clostridium Sordelli* z uwzględnieniem zmienności. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 51-52. J. polski. Oryg. C.
107. Meisel H. i Albrycht H.: Wpływ glikozy, *pH* i żelaza na powstawanie lecytynazy w hodowlach pałeczek z grupy *perfringens*. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 77-78. J. polski. Oryg. B.
108. Meisel H. i Rymkiewicz D.: Antygenowe właściwości zarodników wytwarzanych przez laseczki tężca. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 79-80. J. polski. Oryg. A.
109. Mieczyńska Z. i Wnękowski S.: *Colletotrichum atramentarium* (Besk. Br.) Taub. jako czynnik chorobotwórczy. *Post. Nauk Roln.*, 1957. 4 : 101-111. J. polski. Przegl. L.
110. Mieczyńska Z.: Fuzariozy kukurydzy. *Post. Nauk Roln.*, 1957. 4 : 111-118. J. polski. Przegl. L.
111. Mieczyńska Z.: Bakterioza bawełny spowodowana przez *Ps. malvacearum*. *Post. Nauk Roln., 1957.* 5 : 169-173. J. polski. Przegl. L.
112. Mikulaszek E.: Badania immunochemiczne pałeczki czerwonkowej Shiga przy zastosowaniu własnej metody precypitacji ilościowej. *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, 1957. 9 : 75-89. J. polski. Oryg. A, M.
113. Młodecki H. i Żurkowska T.: Materiały do higienicznej oceny żywności porażonej roztoczami magazynowymi. *Roczn. P.Z.H.*, 1957. 8 : 19-26. J. polski. Oryg. H.
114. Moycho W. i Gromska W.: Antagonizm występujący w mleku między *Streptococcus lactis* a *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 267-270. J. polski. Oryg. D.
115. Możejko M.: Rozkład alkaloidów przez mikroorganizmy glebowe. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 211. J. polski. Oryg. F.
116. Mrygoń J.: Zachowanie się odczynu aglutynacji, wiązania dopełniacza i próby pierścieniowej mleka przy brucellozie. *Med. Wet.*, 1957. 1 : 9-11. J. polski. Oryg. H, M.

Mackiewicz — patrz Rzucidło, poz. 142, 143.
Malanowski — patrz Cabejszek, poz. 26, 27.
Maliszewska — patrz Gołębiowska, poz. 41.
Małachowska — patrz Meduski, poz. 102.
Marcinak — patrz Lorkiewicz, poz. 94.
Markiel — patrz Luchterowa, poz. 97.
Metzger — patrz Ślopek, poz. 166.
Michalska — patrz Bagdasarian, poz. 5, 6.
Mierzejewski — patrz Parnas, poz. 126, 129.
Migdalska — patrz Tysarowski, poz. 170.
Miłkowska — patrz Smyk, poz. 153.
Mokszyszczak — patrz Kryński, poz. 82.
Myśkow — patrz Gołębiowska, poz. 42.

117. Nowotny-Mieczyńska A.: Wirusy — problem naukowy i ekonomiczny. *Kosmos*, 1957. Seria A. 6 : 127-140. J. polski. Przegl. E.
118. Nowotny-Mieczyńska A. i Gołębiowska J.: The influence of microbial population on the phosphorus uptake by some crop plants. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 129-132. J. angielski. Oryg. F.

Niemiro — patrz Borowski, poz. 20.
Nowakowska — patrz Jakubowska, poz. 55.
Nowakowska — patrz Rzucidło, poz. 142, 143.

119. Olszewska M. J.: Budowa jądra komórkowego w świetle badań w mikroskopie elektronowym. *Kosmos*, Seria A., 1957. 2 : 169-178. J. polski. Przegl. A.

Oberman — patrz Jakubowska, poz. 55.
Odrzywolska — patrz Bagdasarian, poz. 5, 6, 7.
Olkowska — patrz Meduski, poz. 103.
Ostrowski — patrz Skarżyński, poz. 148.

120. Pakuła R.: Budowa antygenowa *Streptococcus pyogenes*. „Budowa antygenowa bakterii chorobotw.", *Zeszyty Problem. Nauki Polskiej*, 10 : 137-163. J. polski. Przegl. A.

121. Paluch J. i współpracownicy: Charakterystyka mikrobiologiczna wody zbiornika rzecznego w Kozłowej Górze przeznaczonego dla celów wodociągowych. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 173-180. J. polski. Oryg. G.

122. Paluch J. i A. Szymkiewicz: Stan bakteriologiczny źródlisk rzeki Wisły na zboczach Baraniej Góry. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 197-200. J. polski. Oryg. G.

123. Paluch J. i Dobrzański R.: Próby określenia dynamiki przemiany materii w wodzie zbiornika retencyjnego w Kozłowej Górze. II. Dobowe zmiany tlenu, biochemicznego zapotrzebowania tlenu, dwutlenku węgla, kwaśnych węglanów, stężenia jonów wodorowych, oraz ilości planktonu i bakterii. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 181-186. J. polski. Oryg. G.

124. Paluch J. i współpracownicy: Stan sanitarny górnego biegu Wisły i jej dopływów oraz terenu zalewu w Goczałkowicach. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 187-196. J. polski. Oryg. G.

125. Parnas J.: Próby doświadczalnego przeobrażenia cech odmian pałeczek *Brucella*. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 45-50. J. polski. Oryg. C.

126. Parnas J. i Mierzejewski T.: Badania biochemiczne i immunochemiczne nad pałeczkami *Brucella*. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 353-370. J. polski. Oryg. A.

127. Parnas J. i Chodkowski A.: Zmienność pałeczek *Brucella* kolekcji krajowej. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 371-376. J. polski. Oryg. C.

128. Parnas J. i współpracownicy: Badania nad ogniskowością leptospirozy w lubelszczyźnie. *Kosmos*, 1957. 2 : 196-210. J. polski. Ref. F, G.

129. Parnas J. i współpracownicy: Budowa antygenowa pałeczek *Brucella*. „Budowa antygenowa bakterii chorobotwórczych". *Zeszyty Problemowe Nauki Polskiej*, 1957. 10 : 171-195. J. polski. Przegl. A.

130. Pawełkiewicz J.: Witaminy grupy B_{12} i ich biosynteza. *Post. Bioch.*, 1957. 1 : 3-38. J. polski. Przegl. B.

131. Pawełkiewicz J.: Badania nad biosyntezą związków kobalaminowych. Wyodrębnienie nowych kobalamin z komórek *P. shermani*. *Acta Bioch. Polon.*, 1957. 4 : 581-590. J. polski. Oryg. B.

132. Pawełkiewicz J. i Zodrow K.: Prekursory biosyntezy nukleocyjanokobalamin. *Acta Microbiol. Polon.*, 1957. 6 : 9-16. J. polski. Oryg. B.

133. Pawełkiewicz J. and Zodrow K.: The synthesis of cobalamins by *Corynebacterium diphteriae*. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 319-320. J. angielski. Oryg. B.

134. Pichula K.: Wpływ promieni ultrafioletowych na prątki gruźlicy. *Gruźlica*, 1957. 15 : 595-598. J. polski. Oryg. B.
135. Piechowska M.: Isolation of the enzyme responsible for keratolysis. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 57-64. J. angielski. Oryg. B.
136. Pliszka K.: Bezpośrednie oznaczanie gronkowcowego czynnika toksycznego w wyciągach z żywności. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 253-28. J. polski. Oryg. H.
137. Postolski J.: Możliwości przedłużenia trwałości świeżych ryb. *Gospodarka Rybna*, 1957. 4 : 27-30. J. polski. Przegl. H.
138. Przybyłkiewicz Z. i Rybarska J.: Badania nad sposobem szybkiego oznaczania żywotności prątków BCG w szczepionce. *Gruźlica*, 1957. 15 : 97-107. J. polski. Oryg. B.
139. P. S. i J. T. (Szarski P. i Telacki J.): Antybiotyki przy konserwacji mięsa i przetworów miesnych. *Gosp. Mięsna*, 1957. 5 : 9-14. J. polski. Przegl. D, H.

Pacewiczowa — patrz Gołębiowska, poz. 41.
Pędziwilk — patrz Janicki, poz. 57.
Piasecka-Aleksandrowicz — patrz Janczura, poz. 56.
Pieniak — patrz Lityński, poz. 93.
Przybyła — patrz Wojciechowski, poz. 175.

140. Rojecka N.: Ze studiów nad *Entomosporium maculatum* Lev. — Brunatna plamistość wraz ze sposobami jej zwalczania. *Roczn. Nauk Roln.*, 1957. Seria A, 2 : 255-265. J. polski. Oryg. L.
141. Rojecka N.: Biała bakterioza (*Bacterium stevartii* EF Sm) kukurydzy. *Post. Nauk Roln.*, 1957. 2 : 60-72. J. Polski. Przegl. L.
142. Rzucidło L. i współpracownicy: Własności chemiczne i biologiczne zawiesiny ścian komórkowych drożdżaków *Candida*, *Monilia* i *Geotrichum*. *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, 1957. 9 : 113-125. J. polski. Oryg. A.
143. Rzucidło L. i współpracownicy: Chemical structure and biological properties of the insoluble cellular residue of *Mycobacterium*. *Bull. Ac. Polon. Sci.*, 1957. 5-6 : 201-206. J. angielski. Oryg. A.
144. Rzucidło L.: Budowa antygenowa prątka gruźlicy „Budowa antygenowa bakterii chorobotwórczych". *Zeszyty Problemowe Nauki Polskiej*, 1957. 10 : 207-243. J. polski. Przegl. A.

Radecka — patrz Paluch, poz. 121, 124.
Reinhercs — patrz A. R., poz. 1, 2.
Rudzki — patrz Rzucidło, poz. 142, 143.
Rybarska — patrz Przybyłkiewicz, poz. 138.
Rymkiewicz — patrz Meisel, poz. 108.

145. Sakławska-Szymonowa O. i Gąsior E.: Transaminazy u *Mycobacterii*. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 105. J. polski. Oryg. B.
146. Sander A. i współpracownicy. Typologia form *L* u *Proteus vulgaris*. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 21-26. J. polski. Oryg. C.
147. Shugar D. i Baranowska J.: Application of ^{31}J in quantitative studies on gram staining. *Bull. Ac. Polon. Sci.*, 1957, Ser. Sci. Biol., 5-6 : 159-168. J. angielski. Oryg. A.

Shugar — patrz Baranowska, poz. 11.
Shugar — patrz Jarmolińska, poz. 63, 64.

148. Skarżyński B. i współpracownicy: Investigations on the metabolism of

sulphur in *Th. thioparus* with radioactive sulphur S^{35}. *Bull. Ac. Polon. Sci.*, Ser. Sci. Biol., 1957. 5-6 : 159-164. J. angielski. Oryg. B.

149. Skibniewski C.: Badania nad zwiększeniem wydajności drożdży w gorzelniach melasowych. *Przem. Spoż.*, 1957. 5 : 208-210. J. polski. Oryg. K.
150. Skrodzki E.: Charakterystyka szczepów *B. tularense* wyhodowanych w Polsce w latach 1952-1953. *Biul. Inst. Med. Morskiej* (Gdańsk), 1957. 8 : 51-53. J. polski. Oryg. B.
151. Smyk B.: Badania mikrobiologiczne i chemiczne nad kiszonkami z roślin pastewnych. Cz. II. *Roczn. Nauk Roln.*, Ser. B. 1957. 2 : 313-364. J. polski. Oryg. H, K.
152. Smyk B.: Studia nad bakteriami mlekowymi. Cz. I. Wpływ niektórych czynników wzrostowych. *Roczn. Nauk Roln.*, 1957. Seria B. Zootechnika. 2 : 301-312. J. polski. Oryg. B, K.
153. Smyk B. i Miłkowska A.: Wpływ promieni podczerwonych na dezynfekcję ziarna siewnego. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 133-136. J. polski. Oryg. H.
154. Snaglewska J.: Hodowla drożdży na wywarze po fermentacji acetonowo-butanolowej. *Acta Microbiol. Polon.*, 1957. 6 : 87-98. J. polski. Oryg. K.
155. Snaglewska J.: Oczyszczanie wywaru po fermentacji beztlenowej. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 235-240. J. polski. Oryg. K.
156. Snaglewska J.: Zdrożdżowanie wywaru po fermentacji acetonowo-butanolowej. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 303. J. polski. Oryg. K.
157. Sobieszczański J.: Aparat do badań nad wpływem drobnoustrojów na odżywianie się roślin. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 109-112. J. polski. Oryg. F.

Sobieszczański — patrz Balicka, poz. 9.

Sobieszczański — patrz Gołębiowska, poz. 41.

158. Stangenberg M.: Obecny stan zagadnień ochrony wód przed zanieczyszczeniem w Polsce. *Chrońmy Przyrodę Ojczystą*, 1957. 3 : 2-13. J. polski. Przegl. G.
159. Stawicki S. i Zodrow K.: Badania nad mikroflorą mączki ziemniaczanej. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 305. J. polski. Oryg. H.
160. Strzemska-Buczyńska J.: Przegląd badań nad mikoryzą u roślin zbożowych. Referat w zbiorze prac pod red. J. Gołębiowskiej, pt. „Wybrane zagadnienia z mikrobiologii gleby". *Państw. Wyd. Roln. i Lesne.*, 1957. 183-187. J. polski. Przegl. F.

Strzemska — patrz Gołębiowska, poz. 41.

161. Szember A.: Wpływ dodatku tzw. „chwastu rybnego" na rozwój mikroflory w kiszonkach ziemniaczanych. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 385-400. J. polski. Oryg. K, H.
162. Szurman J. i Larski Z.: Próby oczyszczenia wirusa choroby cieszyńskiej świń oraz przeciwciał surowicy. *Med. Wet.*, 1957. 3 : 139-143. J. polski. Oryg. E.
163. Szynkiewicz Z.: Płynna wzbogacająca pożywka z żółtkiem jaja kurzego do hodowli włoskowców różycy. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 81-84. J. polski. Oryg. M.
164. Szynkiewicz Z.: Czynnik wzrostowy dla włoskowców różycy, zawarty w ekstraktach alkoholowych i acetonowych żółtka jaja kurzego. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 85-88. J. polski. Oryg. B.
165. Szynkiewicz Z.: Próby ekonomicznego wykorzystania mięsa odpadko-

wego do przygotowania bulionu. *Acta Microbiol Polon.*, 1956. 5 : 89-94. J. polski. Oryg. M.

166. Ślopek M. i Metzger M.: Budowa antygenowa pałeczek *Shigella*. „Budowa Antygenowa Bakterii Chorobotwórczych". *Zesz. Problem. Nauki Polskiej*, 1957. 10 : 207-243. J. polski. Przegl. A.

Sadurska — patrz Kowalik, poz. 77, 78.

Sakowska-Wróbel — patrz Hauke-Pacewiczowa, poz. 48.

Sedlaczek — patrz Zabłocki, poz. 178.

Stachów — patrz Rzucidło, poz. 142, 143.

Szafrański — patrz — Heller, poz. 49.

Szarkowska — patrz Heller, poz. 49.

Szarkowski — patrz Heller, poz. 49.

Szarski — patrz P. S. i J. T., poz. 139.

Szewczykowski — patrz Parnas, poz. 128.

Szymkiewicz — patrz Paluch, poz. 122.

167. Truszkowska W.: Obserwacje niektórych grzybów pasożytniczych i saprofitycznych na pędach *Populus euamericana* Bose. w Turwi. *Acta Soc. Botan. Polon.*, 1957. 26 : 257-269. J. francuski. Oryg. F, L.

168. Tudorowski L.: Biologiczne badanie wody metodą J. Gabriela. *Biul. Inst. Gosp. Komun.*, 1957. 3 : 76-79. J. polski. Przegl. G.

169. Turski R.: Rozwój niektórych grup drobnoustrojów glebowych w terenie erodowanych rędzin Lubelszczyzny. Komunikat. Zjazd Naukowy Pol. Tow. Glebozn. w Gdańsku. 4. VII. 1957, wyd. P.T.G., 1957. 47-48. J. polski. Oryg. F.

170. Tysarowski W. i współpracownicy: Zachowanie się hemoprotein w obecności prątków kwasoopornych. II. Wpływ oksy- i methemoglobiny na oddychanie *M. phlei* oraz *M. tuberculosis*, szczep C. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 65-68. J. polski. Oryg. B.

171. Tysarowski W. i Kwiek S.: Zachowanie się hemoprotein w obecności prątków kwasoopornych. III. Redukcja methemoglobiny przez zawiesiny prątków gruźlicy. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 69-72. J. polski. Oryg. B.

Tabaczyński — patrz Sander, poz. 146.

Taniewska — patrz Joszt, poz. 66.

Telacki — patrz P. S. i J. T., poz. 139.

Trembowler — patrz Meisel, poz. 104, 106.

Trzebiński — patrz Balicka, poz. 10.

Tuszkiewicz — patrz Parnas, poz. 128.

172. Utzig J. i Fertig S.: Wpływ kwasów polypyrenowych na wzrost pałeczki *Brucella*. *Med. Weteryn.*, 1957. 5 : 268-270. J. polski. Oryg. B.

Venulet — patrz Janowiec, poz. 62.

173. Węgorek W.: Wpływ preparatów HCH i Chlorodanu na rośliny i mikroflorę zbożową. *Roczn. Nauk Roln.*, 1957. 74 A : 373-392. J. polski. Oryg. F.

174. Wnękowski S.: Śnieć karłowa pszenicy: *Post. Nauk Roln.*, 1957. 3 : 67-74. J. polski. Przegl. L.

175. Wojciechowski E. i Przybyła A.: Właściwości antygenowe szczepów *R. burneti* wyosobnionych w pierwszej epidemii gorączki Q w Polsce. *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, 1957. 9 : 281-287. J. polski. Oryg. A.

176. Wróbel T.: A search of a rapid method for determining the activity of strains of the root-nodule bacteria. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 117-120. J. angielski. Oryg. F, M.

177. Wróbel T. i Gołębiowska J.: Inokuliacja bobowych rastienij klu-

bieńkowymi bakteriami na raznych poczwach. *Acta Microbiol. Polon.*, 1956. 5 : 121-124. J. rosyjski. Oryg. F.

Wiaterowa — patrz Bagdasarian, poz. 8.

Wieniawski — patrz Janowiec, poz. 62.

Wiercieńska — patrz Kunicki-Goldfinger, poz. 86, 87.

Wróbel — patrz Gołębiowska, poz. 45.

178. Zabłocki B. i współpracownicy: The effect on *St. aureus* sensitivity to penicillin of lipo-polysaccharid-protein symplexes isolated from various strains of *E. coli*. *Bull. Ac. Polon. Sci.*, Seria Sci. Biol., 1957. 5/6 : 179-182. J. angielski. Oryg. D.

179. Z. Z. (Ziółtowski Z.): Czy można produkować biologicznie trwałe piwo bez pasteryzacji? *Przem. Ferment.*, 1957. 2 : 355-265. J. polski. Przegl. K.

180. Żywiel J.: Odkażanie wody w przemyśle fermentacyjnym. *Przem. Ferment.*, 1957. 3 : 76-79. J. polski. Przegl. G, K.

181. Żywiel J.: Zastosowanie w skali technicznej promieni nadfioletowych do podnoszenia czystości biologicznej octu. *Prace Inst. i Laborat. Bad. Przem. Roln. Spoż.* 1957. 2 : 58-74. J.polski. Oryg. K.

Zakrzewska — patrz Meduski, poz. 103.

Zbrożyna — patrz Meduski, poz. 103.

Zdybiewska — patrz Paluch, poz. 124.

Zieleniewski — patrz Ber, poz. 15, 16.

Zinkiewicz — patrz Parnas, poz. 128.

Ziołecki — patrz Bogdański, poz. 18.

Ziółtowski — patrz Z. Z., poz. 179.

Zodrow — patrz Pawełkiewicz, poz. 132, 133, Stawicki — poz. 159.

Żelazna — patrz Lorkiewicz, poz. 94.

Żurkowska — patrz Młodecki, poz. 113.

TEMATYCZNY WYKAZ PRAC

A. Cytologia. — Budowa chemiczna i antygenowa
Cytology, chemical and antigenic structure of microorganisms

Baranowska i Shugar — 11
Jarmolińska i Shugar — 63
Krzeczkowska i Iskierko — 83
Kwapiński — 90
Meisel — 105
Meisel i Rymkiewicz — 103
Mikulaszek — 112
Olszewska — 119
Pakuła — 120
Parnas i Mierzejewski — 126
Parnas i współpracownicy — 129
Rzucidło i współpracownicy — 143
Rzucidło i współpracownicy — 142
Rzucidło — 144
Shugar i Baranowska — 147
Ślopek i Metzger — 166
Wojciechowski i Przybyła — 175

B. Fizjologia drobnoustrojów — Metabolizm
Physiology of microorganisms — metabolism

Bagdasarian — 4
Bagdasarian i współpracownicy — 6
Bagdasarian i współpracownicy — 8
Bekierkunst — 12
Bekierkunst i współpracownicy — 13
Ber i Dryżek — 14
Drabikowski — 31
Gąsior — 38

Heller i współpracownicy — 49
Iskierko — 52
Janczura i Piasecka-Aleksandrowicz — 56
Janicki i Pędziwilk — 57
Janota — 59
Janota — 60
Jarmolińska i Shugar — 64
Kałużewski — 67
Kurzepa — 88
Lityński i współpracownicy — 93
Løvtrup — 96
Meisel i współpracownicy — 104
Meisel i Albrycht — 107
Meduski i współpracownicy — 102
Meduski i współpracownicy — 103
Pawełkiewicz — 130
Pawełkiewicz — 131
Pawełkiewicz i Zodrow — 132
Pawełkiewicz i Zodrow — 133
Piechowska — 135
Pichula — 134
Przybyłkiewicz i Rybarska — 138
Sakławska-Szymonowa i Gąsior — 145
Skarżyński i współpracownicy — 148
Skrodzki — 150
Smyk — 152
Szynkiewicz — 164
Tysarowski i współpracownicy — 170
Tysarowski i Kwiek — 171
Utzig i Fertig — 172

C. Genetyka i zmienność drobnoustrojów
Genetics and variability

Fleck i Kozak — 34
Górzyńska — 46
Horoszewicz A. i Horoszewicz J. — 50
Karska — 69
Kozak — 80
Koziński — 81
Kunicki-Goldfinger i współpracownicy — 86, 87
Kwiatkowski i współpracownicy — 89
Lipnicki — 92
Lorkiewicz i współpracownicy — 94
Lorkiewicz — 95
Meisel i Trembowler — 106
Meduski i współpracownicy — 102
Parnas — 125
Parnas i Chodkowski — 127
Sander i współpracownicy — 146

D. Antybioza, antybiotyki i środki antybakteryjne
Antibiosis, antibiotics and bakteriocidal substances

Bagdach — 3
Bagdasarian i Odrzywolska — 7
Ber i Zieleniewski — 15
Ber i Zieleniewski — 16
Borowiecka — 19
Borowski i Niemiro — 20
Gołębiowska i Wróbel — 45
Grunland i Krzywicka — 47
Horoszewicz A. i Horoszewicz J. — 50
Janicki i Pędziwilk — 57
Janowiec i współpracownicy — 62
Kocwa — 72
Korzybski — 73
Moycho i Gromska — 114
P. S. i J. T. (Szarski i Telacki) — 139
Zabłocki i współpracownicy — 178

E. Wirusy i bakteriofagi
Viruses and bacteriophages

Fleck i Kozak — 34
Gabriel — 36
Karska — 69
Kostrzewski — 74
Kovats — 75
Kovats — 76
Kozak — 80
Koziński — 81
Książek — 84
Książek — 85
Makower — 100
Nowotny-Mieczyńska — 117
Szurman i Larski — 162

F. Mikrobiologia gleby i roślin
Microbiology of soil and plants

Balicka i Sobieszczański — 9
Balicka i Trzebiński — 10
Dobrzański i Gawlik — 30
Drożański — 32
Duda — 33
Frydman — 35
Gołębiowska — 40
Gołębiowska i współpracownicy — 41
Gołębiowska i Myśkow — 42
Gołębiowska — 43
Gołębiowska — 44
Gołębiowska i Wróbel — 45
Hauke-Pacewicz i Sakowska-Wróbel — 48
Luchterowa i Markiel — 97
Marszewska-Ziemięcka — 101
Możejko — 115
Nowotny-Mieczyńska i Gołębiowska — 118
Parnas i współpr. — 128
Sobieszczański — 157
Strzemska-Buczyńska — 160
Truszkowska — 167
Turski — 169
Węgorek — 173
Wróbel — 176, 177

G. Mikrobiologia wody i ścieków
Microbiology of water and sewage

Balicka — 9
Buczowska — 22
Buczowski i Dąbrowska — 23
Cabejszek i współpracownicy — 26
Cabejszek i współpracownicy — 27
Joszt i Gańczarczyk — 65
Joszt i współpracownicy — 66
Kluczycki — 70
Macander — 99
Paluch i współpracownicy — 121
Paluch i Szymkiewicz — 122
Paluch i Dobrzański — 123
Paluch i współpracownicy — 124
Stangenberg — 158
Tudorowski — 168
Żywiel — 180

H. Mikrobiologia środków spożywczych i pasz
Mikrobiology of food

Bagdach — 3
Bogdański — 17
Bujak i Kasprzycka — 24
Burbianka — 25
Dłużewski — 29
Gaugusch — 37
Horubała — 51
Jakubczyk — 53
Kryński i Mokrzyszczak — 82
Lipińska— 91
Łachecka — 98
Młodecki i Żurkowska — 113
Mrygoń — 116
Pliszka — 136
Postolski — 137
P. S. i J. T. (Szarski T i Telacki J.) — 139
Smyk — 151, 153
Stawicki i Zodrow — 159
Szember — 161

I. Mikrobiologia przemysłowa (prócz przemysłu fermentacyjnego)
Industrial Microbiology (fermentation excluding)

A. R. (Reinhercs A.) — 1, 2
Czerwińska i Kowalik — 28
Jakubowska i współpracownicy — 55
Kluczycki — 71
Kowalik i Sadurska — 77, 78, 79

K. Przemysł fermentacyjny
Fermentation Industry

Bogdański i Ziołecki — 18
Bujak i Kasprzycka — 24
Górzyńska — 46
Jakubowska — 54
Jankun — 58
Januszewicz — 61
Karczewska — 68
Kocwa — 72
Kovats — 75, 76
Kryński i Mokrzyszczak — 82
Lipińska — 91
Łachecka — 98
Skibniewski — 149
Smyk — 151, 152
Snaglewska — 154, 155 i 156
Szember — 161
Z. Z. (Ziółtowski Z.) — 179
Żywiel — 180, 181

L. Fitopatologia
Phytopathology

Brenejzen — 21
Frydman — 35
Golenia — 39
Gabriel — 36
Książek — 84, 85
Rojecka — 140, 141
Mieczyńska — 109, 110, 111
Truszkowska — 167
Wnękowski — 174

M. Metody pracy laboratoryjnej
Laboratory techniques and methods

A. R. (Reinhercs A.) — 1
Bagdasarian — 4, 5, 6, 7
Bogdański — 17
Borowiecka — 19
Duda — 33
Gołębiowska — 41, 44
Kałużewski — 67
Jakubczyk — 53
Kurzepa — 88
Mikulaszek — 112
Mrygoń — 116
Przybyłkiewicz i Rybarska — 138
Sobieszczański — 157
Szynkiewicz — 163, 165
Wróbel — 176

SKOROWIDZ AUTORÓW DO VOL. VI

str.

Balicka N. i Sobieszczański J. — Gleba jako filtr bakteryjny przy rolniczym wykorzystaniu ścieków miejskich 269

Balicka N. i Sobieszczański J. — Wpływ gleby na *Escherichia coli* wprowadzoną ze ściekiem (doniesienie) 289

Baranowska J. i Shugar G. — The role of proteins in, and the questione of localization of, in the Gram reaction 107

Błaszczak D. — patrz Kunicki-Goldfinger W. i inni

Bril J. i Gołębiowski S. — Szczepy *Brucella suis* wydzielone ze świń po raz pierwszy w Polsce 115

Czarnocka-Roczniakowa B. — Próby otrzymania biomasy paciorkowców mlekowych z serwatki 377

Dobrzański R. — patrz Paluch J. i Dobrzański R.

Drożański W. patrz Kunicki-Goldfinger i współpracownicy

Duda J., Pędziwilk Z. i Zodrow K. — Badania nad występowaniem witaminu B_{12} u roślin motylkowych 233

Duda J. i Kaszubiak K. — Badania nad wpływem podłoża na aktywność antybiotyczną promieniowców glebowych 253

Duda J. i Kaszubiak H. — Badania nad działaniem streptomycyny w warunkach glebowych. I. 345

Duda J., Malińska E. i Pędziwilk Z. — Zależność między zawartością witaminu B_{12} a ilością mikroflory w glebach 355

Filipowicz J. — patrz Paluch J. i inni

Gołębiowska J. — Zastosowanie metody Lochheada do badania rozprzestrzenienia w glebie drobnoustrojów czynnych przy przemianach fosforu 17

Gołębiowski S. — patrz Brill J. i Gołębiowski S.

Górzyńska J. — Poszukiwanie nowych ras drożdży na drodze hybrydyzacji 189

Hulanicka E. — patrz Lorkiewicz Z. i inni

Januszewicz I. — Zmiany własności biochemicznych szczepu *Leuconostoc mesenteroides* w zależności od warunków przechowywania 367

Kaszubiak H., Malińska E. i Pędziwilk Z. — Badania nad wytwarzaniem i składem kobalamin u *Rhizobium meliloti* 239

Kaszubiak H. — patrz Duda J. i Kaszubiak H.

Kluczycki K. — patrz Paluch J. i Kluczycki K.

Kunicki-Goldfinger W. i Rowiński S. — Przyczynek do poznania budowy kolonii bakteryjnej 321

Kunicki-Goldfinger W., Drożański W., Błaszczak D., Mazur J. i Skibińska J. — Bakterie jako pokarm pełzaków 331

str.
Kwapiński J. Budowa chemiczna i antygenowa maczugowców 133
Lorkiewicz Z. — Growth of stabilized *L* forms of *Proteus vulgaris* without the addition of serum and penicillin 3
Lorkiewicz Z., Hulanicka E. i Weinrauder H. — Badania nad budową antygenową form *L 3A* i *3B Proteus vulgaris* 311
Malińska E. — patrz Duda i inni
Malińska E. — patrz Kaszubiak i inni
Mazur J. — patrz Kunicki-Goldfinger i inni
Michalska I. — Flora grzybowa i bakteryjna jako czynnik niszczący wełnę owczą 171
Nowakowska A. — Autoliza drożdży browarniczych i piekarnianych . . 293
Nowakowska A. — Oporność autolizatów drożdżowych na zakażenie mikrobiologiczne 303
Paluch J., Radecka S. i Filipowicz J. — Stan bakteriologiczny górnego biegu Wisły i jej dopływów oraz terenu zalewu w Goczałkowicach . 29
Paluch J. i Dobrzański R. — Próby określenia dynamiki przemiany materii w wodzie zbiornika retencyjnego w Kozłowej Górze. II. Dobowe zmiany tlenu, biochemicznego zapotrzebowania tlenu, dwutlenku węgla, kwaśnych węglanów, stężenia jonów wodorowych oraz ilości planktonu . 49
Paluch J. i Kluczycki K. — Prof. Dr inż. Adolf Joszt 103
Pawełkiewicz J. i Zodrow K. — Wytwarzanie kobalamin przez *Corynebacterium diphteriae* 219
Pawełkiewicz J. i Zodrow K. — Prekursory biosyntezy nukleotydocyjanokobalamin. IV. Wytwarzanie nukleotydocyjanokobalamin przez *Corynebacterium diphteriae* 9
Pędziwilk K. — patrz Duda J. i Zodrow K.
Pędziwilk Z. — patrz Duda J. i Malińska E.
Pędziwilk K. — patrz Duda J. i Zodrow K.
Radecka S. — patrz Paluch J. i inni
Rolicka M. — patrz Szydłowski S. i inni
Rowiński S. — patrz Kunicki-Goldfinger W. i Rowiński S.
Shugar D. — patrz Baranowska J. i Shugar D.
Skibińska J. — patrz Kunicki-Goldfinger i inni
Snaglewska J. — Hodowla drożdży na wywarze po fermentacji acetonowo-butanolowej 87
Sobieszczański J. — patrz Balicka N. i Sobieszczański J.
Sobieszczański J. — patrz Balicka N i Sobieszczański J.
Szydłowski S., Rolicka M. i Zabłocki B. — Otrzymywanie oczyszczonych preparatów kwasu hialuronowego do miareczkowania enzymu — hialuronidazy 211
Weinrauder H. — patrz Lorkiewicz Z. i inni
Zabłocki B. — patrz Szydłowski S. i inni
Zodrow K. — patrz Pawełkiewicz J. i Zodrow K.
Zodrow K. — patrz Pawełkiewicz J. i Zodrow K.
Zodrow K. — patrz Duda J. i inni

SKOROWIDZ RZECZOWY DO VOL. VI

str.

Acetonowo-butanolowej fermentacji wywar, służący do hodowli drożdży . . 84
Ameby — patrz **pełzaki**
Antybiotyczna aktywność promieniowców glebowych a skład podłoża . . 253
Antybiotyki — patrz też **streptomycyna**
Antygenowa budowa — badanie form *L 3A* i *3B Proteus vulgaris* 311
Antygenowa budowa maczugowców 133
Autoliza drożdży piekarnianych i browarniczych 293
Autolizatów drożdżowych oporność na zakażenie mikrobiologiczne . 303
Bakterii i planktonu ilość oraz próby określania dynamiki przemiany materii zbiornika w Kozłowej Górze 49
Bakteryjna i grzybowa flora jako czynnik niszczący wełnę owczą 171
Bakteryjna kolonia — budowa 321
Bakterie jako pokarm pełzaków 331
Bakteriologiczny stan wód górnego biegu Wisły i jej dopływów oraz terenu zalewu w Goczałkowicach 29
Barwienie metodą Grama — rola białek i zagadnienie lokalizacji reakcji . . 107
Białka rola przy barwieniu metodą Grama 107
Biochemiczne zapotrzebowanie tlenu, zmiany w wodzie zbiornika retencyjnego w Kozłowej Górze 49
Brucella suis, szczepy wydzielone ze świń po raz pierwszy w Polsce . . . 115
Chemiczna budowa maczugowców 133
Corynebacterium diphteriae — wytwarzanie nukleotydokobalamin 9
Corynebacterium diphteriae — wytwarzanie kobalamin 219
Corynebacterium — patrz też **maczugowce**
Drobnoustroje czynne w glebie przy przemianach fosforu 17
Dłożdże — hodowla na wywarze po fermentacji acetonowo-butanolowej . . 87
Drożdże — poszukiwanie nowych ras na drodze hybrydyzacji 189
Drożdże browarnicze i piekarniane — autoliza 293
Drożdże — antolizaty, oporność na zakażenia mikrobiologiczne 303
Escherichia coli, wpływ gleby na *E. coli* wprowadzoną ze ściekiem . . . 289
Fosfor — przemiany w glebie 17
Fermentacja — acetonowo-butanolowa, wywar, zastosowanie do hodowli drożdży 87
Gleba — drobnoustroje czynne przy przemianie fosforu 17
Gleba — jako filtr bakteryjny przy rolniczym wykorzystaniu ścieków . . . 269
Gleba — wpływ na *Escherichia coli* wprowadzoną ze ściekiem 289
Gleba — zawartość witaminu B_{12} w zależności od zawartości mikroflory w glebie 355

str.
Glebowych promieniowców aktywność antybiotyczna 253
Grama metoda barwienia — patrz **barwienie** metodą Grama
Grzybowa i bakteryjna flora jako czynnik niszczący wełnę owczą 171
Hialuronidaza — miareczkowanie przy pomocy preparatów kwasu hialuronowego 211
Hialuronowy kwas — otrzymywanie oczyszczonych preparatów do miareczkowania enzymu hialuronidazy 211
Hybrydyzacja drożdży — zastosowanie w poszukiwaniu nowych ras . . . 189
Joszt Adolf, prof. dr inż., wspomnienie pośmiertne 103
Kobalaminy, wytwarzanie przez *Corynebacterium diphteriae* 219
Kobalaminy — badanie nad ich wytwarzaniem i składem w *Rhizobium meliloti* 239
Kobalaminy — patrz też nukleotydokobalaminy i witamin B_{12}
Kolonie bakteryjne — budowa 321
***L* formy** *Proteus vulgaris*, hodowla na pożywce bez surowicy i penicyliny . 3
***L* formy** *3A* i *3B Proteus vulgaris* budowa antygenowa 311
Lochheada metoda — zastosowanie do badania rozprzestrzenienia w glebie drobnoustrojów czynnych przy przemianie fosforu 17
Leuconostoc mesenteroides — zmiany własności biochemicznych w zależności od warunków przechowywania 367
Maczugowce — budowa chemiczna i antygenowa 133
Maczugowce — patrz też ***Corynebacterium***
Mikroflora gleby, zależność od zawartości witaminu B_{12} w glebie 355
Nukleotydokobalaminy, prekursory biosyntezy 9
Nukleotydocyjanokobalaminy — wytwarzanie przez *Corynebacterium diphteriae* 9
Nukleotydokobalaminy — patrz też „**Kobalaminy**", „**Witamin** B_{12}"
Paciorkowce mlekowe, próby otrzymania biomasy paciorkowców z serwatki . 377
Pełzaki — bakterie jako pokarm pełzaków 331
Plankton — ilości, zmiany dobowe w wodzie zbiornika retencyjnego w Kozłowej Górze 49
Proteus vulgaris formy *L* — hodowla na pożywce bez surowicy i penicyliny 3
***Proteus vulgaris*,** budowa antygenowa form *L 3A* i *3B* 311
Promieniowce glebowe — aktywność antybiotyczna 253
Przechowywania warunki, wpływ na zmienność form *L. mesenteroides* . . 367
***Rhizobium meliloti*,** — wytwarzanie kobalamin 239
Rośliny motylkowe — badanie nad występowaniem witaminu B_{12} 233
Serwatka jako substrat do otrzymywania biomasy paciorkowców mlekowych 377
Streptomycyna, badanie jej działania w warunkach glebowych 345
Ścieki zawierające *E. coli* — wpływ gleby 289
Ścieki miejskie, wykorzystanie gleby jako filtru bakteryjnego 269
Tlen, zawartość, zmiany dobowe w wodzie zbiornika retencyjnego w Kozłowej Górze 49
Wełna owcza, niszczenie przez florę grzybową i bakteryjną 171
Witamin B_{12}, występowanie u roślin motylkowych 233
Witamin B_{12}, zależność zawartości od ilości mikroflory w glebie . . . 355
Witamin B_{12} — patrz też „**Kobalaminy**" i „**Nukleotydokobalaminy**"
Wody górnego biegu Wisły i jej dopływów, stan bakteriologiczny 29
Wody zbiornika retencyjnego w Kozłowej Górze, próby określenia dynamiki przemiany materii i ilości bakterii 49
Zmienność własności biochemicznych szczepu *L. mesenteroides* 367

SPIS TREŚCI — CONTENTS

str.

1. Z. Lorkiewicz, E. Hulanicka i H. Weinrauder: Badania nad budową antygenową form *L 3A* i *3B Proteus vulgaris*
   Studies on antigenic structure of *L* forms, type *3A* and *3B*, of *Proteus vulgaris* 311
2. W. Kunicki-Goldfinger i S. Rowiński: Przyczynek do poznania budowy kolonii bakteryjnej.
   Some studies on the structure of bacterial colony 321
3. W. Kunicki-Goldfinger, W. Drożański, D. Błaszczak, J. Mazur i J. Skibińska: Bakterie jako pokarm pełzaków.
   Bacterial food of soil amoebae 331
4. J. Duda i H. Kaszubiak: Badania nad działaniem streptomycyny w warunkach glebowych I.
   Studies on the activity of streptomycin in soil 345
5. J. Duda, E. Malińska i Z. Pędziwilk: Zależność między zawartością witaminu B_{12} a ilością mikroflory w glebach.
   Relationship between the content of vitamin B_{12} and the number of microorganisms in soil 355
6. I. Januszewicz: Zmiany własności biochemicznych szczepu *Leuconostoc mesenteroides* w zależności od warunków przechowywania.
   Effect of storage-conditions on changes in biochemical properties of *Leuconostoc mesenteroides* 367
7. B. Czarnocka-Roczniakowa: Próby otrzymania biomasy paciorkowców mlekowych z serwatki.
   Sudies of biomass production of lactic streptococci on whey 377
8. Bibliografia polskich prac z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolnej i technicznej za I półrocze 1957 r.
   Bibliography of Polish papers on general, agricultural and technical microbiology covering period 1 January — 30 June 1957 403

Skorowidz autorów do vol. VI 421
Skorowidz rzeczowy do vol. VI 423

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej, nigdzie dotychczas nie publikowane, a referowane uprzednio na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub innego towarzystwa naukowego. Czasopismo zamieszcza również referaty przeglądowe.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*, Wrocław, ul. Siemieńskiego 14/8.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku publikacji oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora (ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora (ów), kropka, rok, kropka, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora (ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie; o dodatkowe odbitki autor może zwrócić się do redakcji przy składaniu maszynopisu.

Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów otrzymują „Acta" bezpłatnie, po przekazaniu dodatkowej składki rocznej w wysokości 70,— zł do Sekcji Mikrobiologii Ogólnej PTM (adres: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*, Wrocław, ul. Siemieńskiego 14, m. 8).

Cena zł 25.—

Warunki prenumeraty

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

Cena w prenumeracie zł 100 rocznie, zł 50 półrocznie. Zamówienia i wpłaty przyjmują:

1. Przedsiębiorstwo Upowszechnienia Prasy i Książki „Ruch", Wrocław, ul. Oławska 10/11, konto PKO nr 8-6-13768.

2. Urzędy pocztowe.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę — 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch", Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100024. Bieżące numery do nabycia w księgarniach naukowych „Domu Książki" i we Wzorcowni PWN, Warszawa, ul. Miodowa 10.

Informacji w sprawie sprzedaży egzemplarzy z poprzednich lat udziela Centrala Kolportażu „Ruch". Sprzedaż Prasy Zdeaktualizowanej, Warszawa, ul. Srebrna 12, oraz Wzorcownia PWN, Warszawa, ul. Miodowa 10.